



CNEN/SP

ipen **Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares**

GOVERNO DO BRASIL

**ASPECTOS PRÁTICOS DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS COMO RADIOFÁRMACOS**

Helena OKADA Iracelia Torres de Toledo e SOUZA João Alberto OSSO JUNIOR

IPEN Pub 367

ABRIL/1982

SÃO PAULO

**ASPECTOS PRÁTICOS DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS COMO RADIOFÁRMACOS**

Helena OKADA Iracema Torres de Toledo e SOUZA João Alberto OSSO JUNIOR

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEE/EP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO -- BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13 30

MONOCLONAL ANTIBODIES
RADIOPHARMACEUTICALS
IMMUNOLOGY

IPEN Doc 4308

Aprovado para publicação em 28/02/92

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(a) autor(es)

**ASPECTOS PRÁTICOS DA PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE
ANTICORPOS MONOCLONAIS COMO RADIOFÁRMACOS**

Helena OKADA, Iracelia Torres de Toledo e SOUZA,
João Alberto OSSO JUNIOR

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRASIL

RESUMO

Esta consisa revisão reproduz registros de algumas publicações concernentes a produção e uso de anticorpos monoclonais como radiofarmacos. Faz-se a descrição de alguns conceitos imunologicos importantes para a compreensão do que e um anticorpo monoclonal, princípios e técnicas envolvidas na produção desses reagentes imunologicos e um sistema conveniente de radiomarcção para obtenção de radiofarmacos próprios ao uso em MEDICINA NUCLEAR.

**PRACTICAL ASPECTS OF PRODUCTION AND APPLICATION OF
MONOCLONAL ANTIBODIES AS RADIOPHARMACEUTICALS**

Helena OKADA, Iracelia Torres de Toledo e SOUZA,
João Alberto OSSO JUNIOR

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGETICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - BRAZIL

ABSTRACT

This brief review represents the distillation of many publications to the production and use of monoclonal antibodies as radiopharmaceuticals. It describes some immunological concepts which are important for the understanding of what is a monoclonal antibody, the principles and techniques involved in the production of these immunochemical reagents, a convenient system that can be used to its radiolabelling and acceptance as receptor-specific radiopharmaceuticals in NUCLEAR MEDICINE.

1 SISTEMA IMUNE

Relaciona-se a sobrevivência de qualquer organismo multicelular. Reconhece, destrói ou elimina substâncias nocivas. Tem a capacidade de reconhecer substâncias estranhas entre as quais microorganismos como vírus, bactérias, fungos, parasitas ou seus fragmentos que podem agir como antígenos. Algumas vezes um desses agentes pode invadir uma célula, causar trocas na membrana celular e se a membrana alterada for reconhecida pelo organismo como não próprio desencadeará uma resposta imune contra o que uma vez foi próprio.

Próprio São as estruturas químicas herdadas pelo organismo e as que es tiveram em contato com os órgãos linfóides durante toda a vida embrionária deste organismo. Substâncias estranhas, mas com estrutura química se melhante ao próprio, se reconhecidas como tal, conduzem a tolerância imunológica que é a inabilidade do organismo em responder a provocação an tigenica. O sistema imune tem também a capacidade de auto-reconhecimento de componentes impedindo a destruição do organismo. Um erro no processo de auto-reconhecimento conduz a doença auto-imune onde os constituintes próprios do organismo podem ser reconhecidos como estranhos, de sencadeando uma resposta imune e tornando-se alvos de lesões por parte das células linfóides. Diabetes tipo I parece ser um distúrbio auto-imunológico, isto quer dizer que as células produtoras de insulina são vis tas como não próprias, provocando uma resposta imune e são atacadas pelas células encarregadas de protegerem o organismo contra invasores.

Não próprio Qualquer substância que ao entrar em contato com o organismo é identificada como estranha. As substâncias capazes de desencadear uma reação do sistema imunológico são denominadas ANTÍGENOS. A resposta do organismo ao reconhecer um antígeno é produzir uma proteína chamada ANTICORPO. O organismo reage da mesma forma aos antígenos inócuos e deletérios. Embora o interesse dos imunologistas esteja voltado para os antígenos deletérios foram os antígenos com estrutura química bem de finida e não prejudiciais ao organismo que trouxeram maior contribuição para o estudo do mecanismo imunológico como por exemplo a tolerância.

A função do sistema imune é desenvolvida por um mecanismo com

plexo de células que se comunicam entre si num estado de equilíbrio que é rompido quando o organismo entra em contato com antígenos. Os mecanismos celulares que levam a produção de anticorpos como resposta a um determinado antígeno são extremamente complexos, porém, como não são importantes para o entendimento da técnica de produção de anticorpos não serão aqui descritos. Analisa-se apenas como são vistos os antígenos pelos anticorpos. Os 3 maiores tipos de células envolvidas na malha imune são macrófagos, linfócitos B e linfócitos T.

Macrófagos Os macrófagos estão presentes em diferentes tecidos e órgãos são as células defensoras do organismo a um antígeno não próprio. Em consequência da presença de um antígeno o macrófago modifica-se morfológica e funcionalmente. Elevam-se o conteúdo enzimático, a atividade de síntese proteica e a taxa de fagocitose. Através do processo de fagocitose um macrófago aprisiona e absorve o antígeno. Uma vez dentro da célula a molécula antigênica é degradada pelos enzimas do macrófago e digerida. As moléculas que permanecem intactas localizam-se na membrana celular do macrófago permitindo que linfócitos B (produtores de anticorpos) entrem em contato direto com o antígeno.

A atividade imune depende da existência de células linfóides que se originam de células indiferenciadas provenientes da medula óssea. Essas células originam 2 tipos principais de linfócitos: LINFÓCITOS B que se diferenciam sem a influência do timo (primeiro órgão linfóide a aparecer durante o desenvolvimento embrionário), responsáveis pela atividade humoral e LINFÓCITOS T que se diferenciam sob a influência do timo, responsáveis pela atividade celular.

Linfócitos B São as principais células brancas do tecido linfóide. Nas membranas dos linfócitos B existem receptores especiais que permitem o reconhecimento e interação com a molécula do antígeno. A resposta imune resulta na geração de grupos heterogêneos de moléculas de anticorpo tendo em comum a habilidade de reagir com o antígeno.

Linfócitos T Diferenciados no timo, regulam a resposta imune das células B. Quando ativados não secretam anticorpos mas substâncias solúveis com atividades biológicas específicas que atuam nas reações de imunidade celular. Os linfócitos T são células pequenas que circulam no organismo como supervisores. As interações com um antígeno ocorrem em uma a

rea muito restrita limitrofe da presença do antígeno diferindo das células B, cujas células finais (anticorpos) circulam livremente com longo alcance

A resposta imune, seja humoral ou celular, para ser estimulada necessita da presença do macrófago que processa e apresenta os antígenos aos linfócitos B e T

O sistema imune possui dois grandes mecanismos de resposta a introdução de um antígeno. São as respostas inespecíficas e específicas. A resposta inespecífica ocorre, usualmente, quando o antígeno é introduzido no organismo pela primeira vez. Fagocitose e inflamação representam a maioria das respostas inespecíficas. A resposta específica ocorre quando o mesmo antígeno é introduzido em ocasiões subsequentes. O sistema imune, quando recarregado com este agente o reconhece como estranho e fornece uma resposta rápida. Nesta resposta a memória representa importante papel. O produto de uma resposta imune específica reage com um agente idêntico ou muito similar ao primeiro agente que provocou a resposta inicial. Isto é conhecido como especificidade.

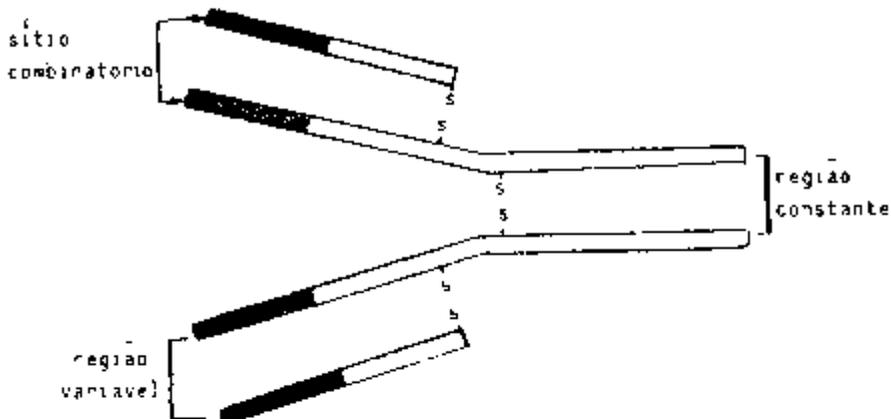
Antígenos São substâncias que atuam sobre um número limitado de linfócitos, interagindo especificamente com receptores destas células, induzindo resposta imune específica. Um antígeno capaz de despertar uma resposta imune específica é chamado imunogênio. Aparentemente o único requisito para que uma substância seja antigênica é ter um tamanho mínimo, de preferência uma macromolécula de peso molecular superior a 10 000 daltons. As macromoléculas apresentam sequência de aminoácidos (ou outras sequências orgânicas) que serão reconhecidas como não próprio ao organismo. Esta região da molécula, denominada determinante antigênico ou epítopo, cabe no sítio combinatorio de receptores de linfócitos provocando a resposta imune. O antígeno possui duas propriedades: imunogenicidade (capacidade de induzir uma resposta imune) e antigenicidade (capacidade de interagir com os anticorpos). Todas as substâncias imunogênicas são também antigênicas, porém o inverso não é verdadeiro. Existem substâncias denominadas haptenos, geralmente de peso molecular baixo (menores que 4 000 daltons) que somente quando ligadas a uma molécula maior (molécula carreadora) induzem a resposta imune, mas são capazes, por si so, de interagir com o anticorpo.

A presença de um antígeno desencadeia um estado de alerta nas células especializadas, linfócitos B, que têm a propriedade de reconhecer seletiva e precisamente as substâncias estranhas. Os linfócitos B possuem receptores nas membranas que permitem a interação com as moléculas do antígeno. Estima-se que existem no organismo humano milhões de linfócitos B diferentes, distribuídos pelos vários tecidos linfóides e sangue circulante. Um linfócito B expressa em sua membrana um só tipo de receptor e os descendentes deste linfócito continuam expressando o mesmo receptor formando o que se chama um clone de linfócitos e esta geneticamente preparado para produzir um único tipo de anticorpo para este clone. Cada determinante antigênico ou epítopo do antígeno ativa o clone cujo receptor lhe seja complementar. Como existem milhões de clones diferentes e multiplicidade de determinantes antigênicos ou epítopos no antígeno a ativação dos linfócitos B resulta na síntese e secreção de anticorpos com diferentes especificidades antigênicas.

A resposta imune resulta na geração de moléculas de anticorpo, proteínas globulares denominadas imunoglobulinas. Já é longamente reconhecido que as imunoglobulinas são grupos de moléculas altamente heterogêneas presentes nos fluidos circulantes do corpo em estado de equilíbrio dinâmico entre compartimentos intra e extra vascular. Existem 5 classes de imunoglobulinas - IgM - IgG - IgA - IgE - IgD, cujas moléculas diferem entre si quanto a sequência primária e o número de cadeias que as constituem. Estas proteínas, além das diferenças estruturais, apresentam funções distintas. IgM - é a maior imunoglobulina sintetizada durante a exposição inicial com o antígeno, IgG - é produzida durante a segunda e subsequente exposição com o antígeno, e a principal imunoglobulina presente na circulação dos fluidos corpóreos, IgA - presente predominantemente nos fluidos secretores, tem papel importante na proteção do organismo contra microorganismos patogênicos, IgE e IgD - são encontradas na circulação dos fluidos corpóreos por apenas alguns minutos. A resposta imune não se direciona para a produção de IgA, IgE e IgD - mas estas imunoglobulinas servem como ilustração para a natureza dinâmica da resposta imune e da existência de diversas variáveis associadas com o estudo da produção endógena de imunoglobulinas.

A molécula de anticorpo possui uma região dita constante e outra dita variável. É nesta última que se localiza o sítio combinato-

rio onde se dá a ligação antígeno-anticorpo. É ligação muito específica tipo "chave-fechadura", cada anticorpo só se liga ao antígeno correspondente.



Os anticorpos para uso em laboratório são produzidos por injeções repetidas de preparações do antígeno em animais de laboratório. O sistema imunológico do animal será ativado e os anticorpos produzidos passarão a circulação sanguínea, podendo ser coletado. Por apresentarem anticorpos produzidos por vários clones o soro produzido é dito policlonal. Os anticorpos produzidos da maneira convencional vem sendo utilizados há muito tempo em laboratório como reagentes biológicos, sobretudo para detectar a presença de determinada macromolécula numa mistura. A proteína anticorpo que aparece no soro sanguíneo pode ligar-se fortemente, embora de forma reversível, a molécula do antígeno que provocou a sua formação. A afinidade e especificidade dos anticorpos para seus antígenos foram estudadas por Yalow e Berson no desenvolvimento das TÉCNICAS DO RADIOIMUNOENSAIO, associação das características de certas reações imunológicas às extremas sensibilidade e precisão das medidas físicas da radioatividade na quantificação precisa e sensível de concentrações extremamente baixas de hormônios no sangue. O hormônio a ser determinado é usado como antígeno.

2 ANTICORPO POLICLONAL

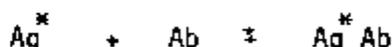
Antígeno específico (Ag)

Antígenos específicos (Ag), injetados em animais de laboratório sintetizam anticorpos (Ab), reagentes essenciais para o desenvolvimento das técnicas de radioimunoensaio (RIE), reação imunológica *in vitro* entre a proteína anticorpo (Ab) e a molécula do antígeno (Ag) que provocou a sua formação. A afinidade entre antígeno e anticorpo (imunorreatividade) pode ser testada, entre outras técnicas, pelo radioimunoensaio.

O radioimunoensaio baseia-se na reação imunológica *in vitro* entre um antígeno (Ag) e o anticorpo (ab) que lhe é específico



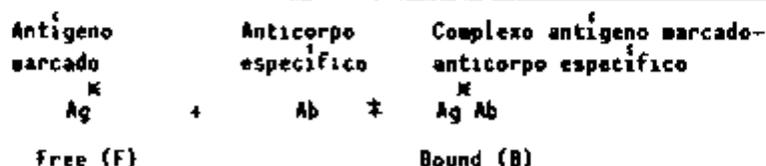
Baseia-se ainda no fato de um antígeno marcado (Ag^*) (molécula que apresenta um ou mais átomos radioativos, apresentar, no sistema de ensaio, comportamento idêntico ao da molécula não marcada (Ag))



Assim para o desenvolvimento das técnicas de radioimunoensaio são necessários

- Antígeno marcado (Ag^*) e antígeno não marcado,
- Anticorpo específico (Ab)

Reações de competição constituindo a base para o radioimunoensaio



+

Ag (antígeno em soluções-padrão ou amostras desconhecidas)

++

AgAb (complexo antígeno não marcado-anticorpo específico)

Colocando-se antígeno marcado (Ag^*) em contato com o anticorpo específico (Ab) forma-se o complexo (Ag^*Ab) e estabelece-se um equilíbrio dinâmico entre o complexo (onde Ag^* está sob a forma ligada (B) Bound) e seus elementos constitutivos (Ag^*) (forma livre da substância marcada e (Ab) (anticorpo específico)

A adição a este sistema de substância não marcada (Ag) vai deslocar da formação de Ag^*Ab uma fração de (Ag^*) proporcional as quantidades relativas de (Ag) por competição com os sítios de (Ab) Como consequência haverá um decréscimo da concentração de (Ag^*Ab) face ao aparecimento de ($AgAb$) aumentando assim a concentração de Ag^* no meio Assim, a relação entre a substância marcada ligada ao anticorpo (B) e a substância marcada livre (F) representada como B/F diminui a medida que a concentração do antígeno não marcado (Ag) aumenta A relação B/F pode ser calculada medindo se separadamente a radioatividade do complexo (Ag^*Ab) e do Ag^* livre

Um sistema como o descrito, no entanto somente será útil se for possível separar de maneira prática e eficiente, as frações livres e combinadas do antígeno marcado

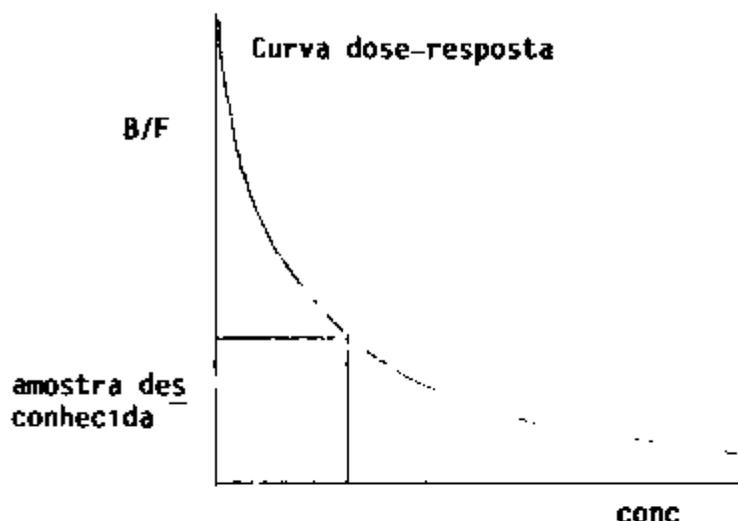
Desde que, em condições usuais de ensaio o complexo Ag^*Ab não precipita espontaneamente, a separação das frações livres e combinadas é feita através de vários sistemas de separação

Os métodos de separação foram desenvolvidas com base em 3 princípios gerais que podem ser esquematizados

- 1 Migração diferencial (cromatoeletroforese, eletroforese, gel de filtração)
- 2 Adsorção do antígeno livre (celulose, sílica ou talco, carvão ativado)
- 3 Precipitação do complexo (segundo anticorpo-antigamaglobulina precipitante, fracionamento com solvente, anticorpo ligado a fase sólida)

O ensaio em si compreende a incubação do antígeno marcado (Ag^*) e do antígeno livre (Ag) (amostras e padrão) com o anticorpo específico (Ab) processando-se a reação de competição Atendido o equilíbrio de reação faz-se a separação da fração livre (Ag^*) da complexada (Ag^*Ab) e a contagem da radioatividade de uma das fases ou de ambas estabelecendo-se as relações B/F do padrão e das amostras desconhecidas Com os valores de B/F constroem-se a curva padrão (B/F vs concentração)

O valor de B/F para a amostra desconhecida levado a curva-padrão, permite através da leitura direta a determinação da substância em estudo. A curva-padrão pode ser construída colocando-se B/F, B, F, B/T como função do padrão.



Reagentes essenciais usados no radioimunoensaio antígeno
marcado (Ag^*) e anticorpo específico (Ab)

Antígeno marcado (Ag^*)

A marcação de um antígeno envolve

- Escolha de um radionuclídeo
- Incorporação do mesmo no composto
- Grau de iodação
- Purificação e avaliação do composto quanto as suas características que o adequam ao radioimunoensaio

ESCOLHA DO RADIONUCLÍDEO

Baseia-se essencialmente na

- Atividade específica (concentração da radioatividade, ou seja, relação entre a massa do material radioativo e a atividade)
- Meia-vida física
- Facilidade em introduzi-lo na molécula
- Estabilidade do produto
- Facilidade de detecção e preço

O ^{125}I Iodo pela sua maior abundância isotópica (numero de átomos radioativos por numero total de átomos do elemento), maior eficiência de contagem dos cristais de NaI para sua radiação γ de baixa energia e meia-vida relativamente longa (60 dias) e o radionuclídeo de escolha para a marcação do antígeno usado no radioimunoensaio

INCORPORAÇÃO DO RADIONUCLÍDEO (^{125}I)

A radiiodação é um dos métodos mais comuns para a marcação de proteínas. A incorporação do ^{125}I ocorre pela substituição do hidrogênio de um dos grupamentos de amino-ácidos na estrutura da molécula pelo iodo radioativo. Entre os amino-ácidos capazes de reagirem com o ^{125}I (cisteína, tirosina, histidina, triptofano, metionina) a tirosina e histidina apresentam melhores reações de substituição. Frequentemente a química da radiiodação é a substituição do hidrogênio pelo iodo radioativo nos grupos tirosílicos.

GRAU DE IODAÇÃO

É o numero medio de ^{125}I introduzido na molécula da proteína. Somente o iodo na sua forma livre (I_2) reage com a proteína. Como o radioiodo fornecido comercialmente esta na forma de I^- (iodeto) e necessário o uso de agentes oxidantes para converter o I^- (iodeto) para I_2 (iodo molecular).

Pelo fato do antígeno (Ag) a ser quantificado encontrar-se em níveis extremamente baixos, o antígeno marcado (Ag^*) usado no radioimunoensaio deve ser igualmente baixo. Para que a razão de contagem, apesar de uma concentração baixa de (Ag^*) seja satisfatória e necessário a obtenção de (Ag^*) com atividade específica alta. Embora a meta seja a da maior atividade específica, a mesma deve ser limitada afim de não danificar a molécula com diminuição da imunorreatividade. Foi encontrado, na separação de radioinsulinas de diferentes "numeros de iodo" por eletroforese em gel de amido, que as frações mais fortemente usadas exibem diminuição de imunorreatividade.

MÉTODOS DE MARCAÇÃO

1 Oxidação química

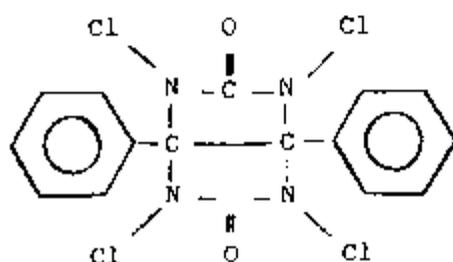
- Cloramina T (Hunter e Greenwood, 1963)

- Iodogen (Fraker e Speck, 1978)
- "Iodobeads" (Markweel, 1982)
- Cloramina T (Hunter e Greenwood, 1963)

Sal sódico N-monocloro derivado do p-tolueno -sulfamida que em solução aquosa libera lentamente ácido hipocloroso levando a condições de oxidação alcançando incorporação quantitativa de iodo. A reação é interrompida com metabissulfito de sódio que reduz o excesso de cloramina T. Pequenas quantidades de proteína (1-5 µg) podem ser usadas com atividade específica alta.

A cloramina T tem sido apontada como um dos principais fatores de dano a molécula. Para minimizar o dano molecular tem-se recorrido a radioiodações com algumas modificações tais como:

- Diminuição de quantidade do agente oxidante, cloramina T, na proporção de 1:1 em relação ao substrato.
- Adição progressiva e em quantidades controladas de cloramina T, nas exatas proporções das massas envolvidas na reação e não em excesso como nas técnicas convencionais. Acompanha-se a cinética da reação através de amostragens sucessivas que permitirão avaliar o progresso do rendimento até o alcance do percentual de incorporação suficiente para a atividade específica desejada.
- Iodogen (Fraker e Speck, 1978)



Estrutura molecular do Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenilglicourel) Peso molecular=432,09

Foi descrito primeiramente por Fraker e Speck (1978) como um reagente para iodação de proteínas e membranas celulares. Intervém na iodação rápida e em fase sólida (potencialmente menos destrutiva) em solução aquosa de I^- (iodeto) e proteína. É preparado em solvente orgânico e distribuído em tubos de reação. A remoção do solvente, por simples evaporação, resulta na formação de um fino filme na base do tubo. Os tubos de reação, assim revestidos, são preparados com antecedência e estocados por um período de até um ano em dissecador a $-20^{\circ}C$. Pela sua natureza hidrofóbica mantém-se imobilizado na base do tubo de reação. A iodação da proteína é desenvolvida por simples adição do ^{125}I seguido pela proteína nas quantidades adequadas para a atividade específica desejada. O tempo de reação é tipicamente de 10 minutos a temperatura ambiente. O iodogen permanece em fase sólida durante a reação de iodação e a proteína é difundida na área em que está contido o reagente. A reação é interrompida pela simples remoção do produto marcado do tubo de reação.

- "Iodobeads" (Marckweel, 1982)

N-cloro-benzeno-sulfamida, ligado covalentemente a esferas de poliestireno. São disponíveis comercialmente com o nome de "Iodobeads". A reação entre $Na^{125}I$ e a proteína tem início com a adição de um ou mais "Iodobeads" e é encerrada por remoção do "Iodobeads" da mistura de reação.

2 Oxidação enzimática (Marchalonis, 1969)

O procedimento enzimático tem a vantagem de não empregar agentes oxidantes ou redutores embora faça uso de pequenas quantidades de H_2O_2 como catalizador. No lugar de oxidantes químicos como cloramina T, iodogen e "Iodobeads", usa-se o enzima lactoperoxidase para oxidação do I^- (iodeto) para I_2 . O enzima age em 2 estágios:

1- Oxidando I^- para formar I_2

2- Catalizando a reação entre I_2 , H_2O_2 e tirosina para formar o produto radionodado.

A desvantagem deste método é a contaminação que pode ocorrer as proteínas marcadas com pequenas quantidades de lactoperoxidase radioiodada exigindo uma purificação adicional. Para obviar este inconveniente, David (1972) recomenda o uso do reagente "Enzymobead".

- "Enzymobead" (David, 1972)

Consiste de preparações imobilizadas de lactoperoxidase e glicose oxidase os quais são cuidadosamente misturados para a obtenção de uma atividade enzimática ótima. A suspensão de "enzymobeads" adiciona-se glicose, Na^{125}I e proteína. O enzima glicose oxidase imobilizado, por ação da glicose adicionada, produz pequenas quantidades de H_2O_2 . O enzima lactoperoxidase, em seu turno, cataliza a oxidação do I^- para formar I_2 usando a H_2O_2 formada *in situ*. O I_2 reage com o resíduo tirosina da proteína e produz a proteína radiotodada. A reação é encerrada por remoção do reagente "enzymobeads" por centrifugação.

3 Iodação eletrolítica (U Rosa, 1964)

Consiste essencialmente na liberação de iodo molecular I_2 a partir de Na^{125}I através da corrente elétrica. A técnica utiliza um cadinho de platina como catodo e um fio de platina como anodo. A proteína e o iodeto radioativo ficam contidos no cadinho. Uma diferença de potencial conveniente entre o cadinho e o fio de platina libera vagarosamente o iodo radioativo. Controla-se a velocidade e o grau de iodação variando o fluxo da corrente e tempo de exposição.

4 Metodo de marcação por conjugação (Bolton e Hunter)

Indicado para iodação de peptídeos que não possuem resíduos tirosila ou que tenha reatividade alterada pela iodação dos grupos tirosila. Uma molecula de ester é marcada com ^{125}I pelo metodo da cloramina T e que se conjuga a qualquer grupo amínico livre de uma molecula de proteína.

EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO

Apos qualquer procedimento de radiomarcção é aconselhavel medir o percentual de incorporação do ^{125}I a molecula proteica. A eficiência da marcação pode ser avaliada através de varias tecnicas

- 1 Adsorção do marcado livre
- 2 Precipitação por ácido
- 3 Cromatoeletroforese
- 4 Cromatografia miniaturizada

1 Adsorção do marcado livre

Envolve a adsorção do marcado livre a material insolúvel e sua subsequente precipitação. São convenientes pela rapidez, simplicidade, reprodutibilidade e por permitirem o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. Entre os adsorventes os mais utilizados são o talco e o carvão ativado. Separam, após centrifugação, a fração intacta da substância radioiodada da fração danificada durante a radioiodação e ^{125}I livre que permaneceu no sobrenadante. O percentual de reatividade no precipitado em relação a atividade total (radioatividade do sobrenadante + radioatividade do precipitado) indicam o percentual de incorporação do ^{125}I .

2 Precipitação por ácido

Ácido tricloroacético (TCA 10%). A fração intacta da substância radioiodada é precipitada pelo TCA 10%.

3 Cromatoeletroforese

No procedimento de cromatoeletroforese o fluxo hidrodinâmico e o principal responsável pela separação dos componentes da mistura de radioiodação. O papel de cromatografia Whatman 3MM e 3 Mc são os mais usados. A eletroforese simultânea traz como vantagem o aumento da velocidade de separação com a identificação do substrato marcado danificado e iodeto radioativo livre. O fluxo hidrodinâmico cromatográfico, sem a eletroforese, é quase satisfatório realmente a única vantagem da cromatoeletroforese é a decomposição da fração danificada e iodeto radioativo livre. A cromatoeletroforese é técnica capaz de discriminar os índices de ^{125}I .

O exame minucioso ao longo da fita de papel identificam 3 picos

- 1- O pico na origem corresponde a fração intacta da substância radioiodada que é adsorvida no sítio de aplicação do papel
- 2- Um pico correspondendo a faixa de migração das proteínas séricas representando a fração degradada da substância radioiodada
- 3- Um pico significativamente distante das proteínas séricas correspondente a zona de migração do iodeto livre (^{125}I)

A eficiência da radioiodação é expressa como a percenta-

gem da radioatividade total (soma da radioatividade dos 3 picos) em relação ao pico de origem

4 Cromatografia miniaturizada

Utilizando sistema de papel e solvente específico e possível quantificar os componentes radioquímicos dentro da preparação radioiodada com base na migração perceptível ao longo do cromatograma

Este sistema é de baixo custo, avaliação rápida, exato e reprodutível. A vantagem está no fato de as impurezas moverem-se com a frente do solvente (Rf 0,1-1,0) enquanto que a substância marcada permanece próxima a origem (Rf 0,0-0,3), isto permite cortar a fita ao meio (Rf 0,5) e ensaiar os 2 segmentos. Um efetivo e conveniente sistema de cromatografia miniaturizada utiliza papel Whatman 3MM (1,0cm x 6,5 cm) como suporte e solventes apropriados. As amostras são aplicadas na origem (1,0 cm da base do papel) e as fitas colocadas em recipientes contendo 1 ml de solvente. O cromatograma é desenvolvido para uma distância de 5 cm. Este percurso é alcançado ao redor de 10 minutos. As fitas são removidas, secas e cortadas ao meio (seção 1 e seção 2) entre a origem e a frente do solvente. A atividade de cada seção é comparada com a atividade total da fita (seção 1 + seção 2) a fração intacta da substância radioiodada e adsorvida na origem (seção 1) e a fração degradada e ^{125}I livre cromatografados com a frente do solvente (seção 2)

PURIFICAÇÃO DO PRODUTO RADIOIODADO

Apesar dos cuidados utilizados no desenvolvimento da marcação propriamente dita, a estrutura da proteína sofre agressões que se traduzem, a par da presença de moléculas de proteínas marcadas, pela de frações moleculares igualmente marcadas, porém danificadas e ^{125}I livre. Para uma pureza radioquímica a preparação deve ser livre de ^{125}I que não reagiu e produtos de degradação da proteína radioiodada. Assim logo após a radioiodação o produto marcado deve ser submetido a um sistema de purificação. Entre os vários métodos o mais comum é a cromatografia em coluna de exclusão molecular (gel Sephadex)

O gel Sephadex separa as proteínas de acordo com o peso molecular. As moléculas menores penetram nos poros do gel movendo-se lentamente através da coluna. As moléculas maiores, por exclusão, movem-se rapidamente sendo eluídas em primeiro lugar. Escolhe-se a granulação de

Sephadex adequada para cada tipo de antígeno. O Sephadex G-50 é usado para moléculas com peso molecular menor ou igual 10 000 daltons. Para moléculas maiores usa-se Sephadex G-100 ou G-200. A coluna é preparada por empacotamento do Sephadex, previamente intumescido no tampão uso e o conteúdo do tubo de marcação é adicionado ao topo da coluna. A eluição é feita com o tampão apropriado colhendo-se frações de 1 ml de efluente. Os picos de atividade das frações eluídas correspondem aos 3 elementos: molécula radioiodada íntegra, molécula radioiodada degradada e iodo livre. As frações degradadas são eluídas no início, a seguir a molécula íntegra sendo o ^{125}I livre retido por mais tempo em consequência do seu peso molecular menor.

PUREZA RADIOQUÍMICA

A pureza radiquímica é avaliada utilizando os mesmos métodos usados na determinação da eficiência de marcação.

Anticorpo específico (Ab)

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS USADOS EM LABORATÓRIO

Os anticorpos para uso em laboratório são produzidos por injeções repetidas de preparações de antígenos em animal de outra espécie. O sistema imunológico do animal será ativado e os anticorpos produzidos passarão a circulação sanguínea. Após um intervalo apropriado o sangue estará rico em anticorpos específicos capazes de reagirem com o antígeno formador. Vários fatores contribuem para a imunogenicidade de uma substância:

- 1 Tamanho e natureza química da molécula do antígeno
- 2 Adjuvante e dose total do imunogeno
- 3 Escolha da espécie animal e vias de administração
- 4 Intervalo de tempo das injeções e tempo de sangria

1 Tamanho e natureza química da molécula do antígeno

Quanto maior a complexidade molecular maior a imunogenicidade. Os anticorpos são relativamente bem produzidos contra qualquer proteína de peso molecular superior a 10 000 daltons. Quanto maior for a molécula antigênica maior será o número de epitópos aumentando assim a probabilidade de interação com os receptores. Existem algumas substâncias de baixo peso molecular que apresentam considerável imunogenicidade como por exemplo hormônio pancreático glucagon (3 000 daltons), angiotensina (1 031 daltons). Não está esclarecido ainda se todas estas moléculas de pesos moleculares baixos são por si só imunogênicas, ou se, ao serem inoculadas combinam a proteínas do receptor que atuariam como proteínas carreadoras destas moléculas pequenas. Peptídeos pequenos e substâncias não imunogênicas tais como hormônios da tireoide, esteroides, drogas, etc necessitam ser conjugadas a moléculas maiores como albumina, tireoglobulina, etc para que haja estímulo do sistema imunológico.

2 Adjuvante e dose total do imunogeno

ADJUVANTE São substâncias utilizadas para intensificar a resposta imune. O método geral para induzir a formação de anticorpos é injetar certo número de animais com antígeno misturado com adjuvante sendo o mais

empregado o adjuvante de Freund (óleo mineral acrescido de lanolina ou arlacel, emulsificadores) O adjuvante de Freund completo (acrescido de *Mycobacterium tuberculosis* - que produz um estímulo não específico no sistema imunológico) e usado nas injeções iniciais Nas reimmunizações usa-se o adjuvante de Freund incompleto O adjuvante aumenta a formação e persistencia de anticorpos quando administrados junto com o antígeno fornecendo imunogenicidade sem interferir na especificidade da resposta imune Aumentam a produção de anticorpos por induzirem a uma reação inflamatória local Retardam a adsorção, a destruição e a eliminação do antígeno permitindo uma estimulação imunogênica mais prolongada Mantem uma elevada concentração serica do antígeno e evitam a sua degradação por enzimas proteolíticos Baseados no fato de impurezas poderem exercer efeito adjuvante, alguns investigadores preferem imunizar animais usando materiais relativamente impuros

DOSE DO IMUNÓGENO Em geral 0,2 a 2 mg do preparado imunogênico e injetado em suspensão Casos ha em que são necessarios maiores ou menores quantidades de antígeno A resposta não depende diretamente da dose e uma vez ultrapassado um limite mínimo e praticamente a mesma para qual quer dose Admite-se a existencia de um valor maximo de dose, que se ultrapassado leva a uma diminuição na produção de anticorpos, alem de causar efeitos colaterais nos animais injetados como por exemplo a insulina que pode induzir a hipoglicemia e ate a morte do animal

3 Escolha da especie animal e vias de administração

ESCOLHA DA ESPÉCIE ANIMAL A seleção da especie animal depende mais do volume de soro desejado do que qualquer outro fator Coelhos e cobaias são os animais mais usados para esta finalidade pois são suficientemente grandes para sobreviverem as sangrias e suficientemente pequenos para serem facilmente manuseados e sem necessidade de um espaço muito grande para serem mantidos Desde que animais da mesma especie possuem capacidade variada de resposta a um dado imunogeno, a probabilidade de se conseguir um anticorpo satisfatorio aumenta com o numero de animais imunizados Geralmente imunizam-se varios animais ao mesmo tempo para aumentar a possibilidade de obtenção de anticorpos adequados, pois não se pode prever o grau de resposta do animal ao estímulo imuno

logico Não se conhece nenhuma forma para a produção de anticorpos sensíveis, pode-se somente selecioná-los

VIAS DE ADMINISTRAÇÃO A inoculação parenteral de antígenos pode ser feita pelas vias subcutânea, intradérmica, intramuscular, endovenosa e intraperitoneal, porém um imunogeno misturado com adjuvante tem como via mais eficaz a intradérmica, subcutânea, podendo as vezes usar múltiplos sítios subcutâneos e intramuscular. Um efetivo e conveniente regime de imunização utiliza cobaia ou coelho, emprega injeção subcutânea de 0,5 ml de suspensão contendo aproximadamente 0,25 mg do antígeno emulsificado no adjuvante de Freund completo

4 Intervalo de tempo das injeções e tempo de sangria

A resposta imunitária é relativamente lenta após a injeção primária. Ocorre um período de latência (fase LAG) que compreende o in

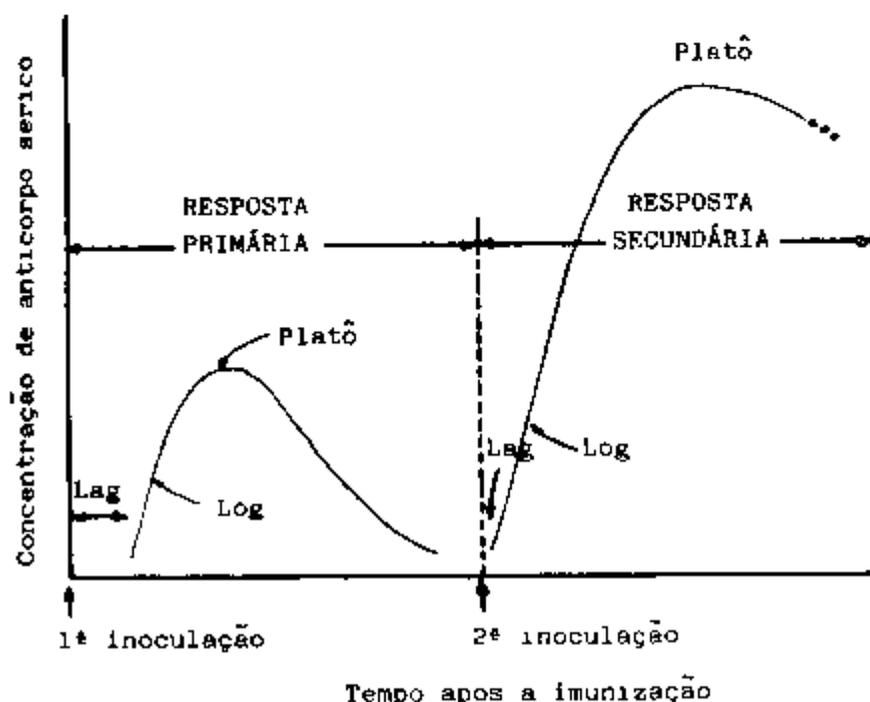


Fig 1 Produção de anticorpos durante as respostas primárias e secundárias a um antígeno

tervalo entre a inoculação e o aparecimento de anticorpos específicos de tetaveis. A seguir verifica-se um aumento exponencial da sua concentração (fase LOG) entrando depois na fase de plato ou de repouso onde não ha aumento nem diminuição do nível serico. A ultima fase da resposta primaria (fase de DECLÍNIO) inicia-se quando a velocidade de degradação prevalece sobre a velocidade de síntese resultando na diminuição do nível de anticorpos. O nível de anticorpos e mantido quando degradação e síntese se igualam. Faz-se uma primeira sangria para testar a presença de anticorpos. A imunização e continuada somente com os animais que apresentam titulo crescente de anticorpo. Esses animais recebem doses de reforço. A injeção de reforço desperta a resposta secundaria que necessita menor dose de antígeno. A fase LAG e mais acentuada com produção rapida e abundante de anticorpos IgG de alta afinidade pelo antígeno que induziu a sua formação, a fase PLATÔ atingida rapidamente e longa e a de DECLÍNIO lenta e persistente.

Nas respostas primarias assim como nas secundarias ha produção de IgM e IgG porem a produção de IgG na resposta primaria começa mais tarde que a IgM e na resposta secundaria a IgG e a imunoglobulina predominante. Nas respostas primarias e secundarias a concentração de IgM serica diminue rapidamente enquanto que a produção de IgG e mais persistente.

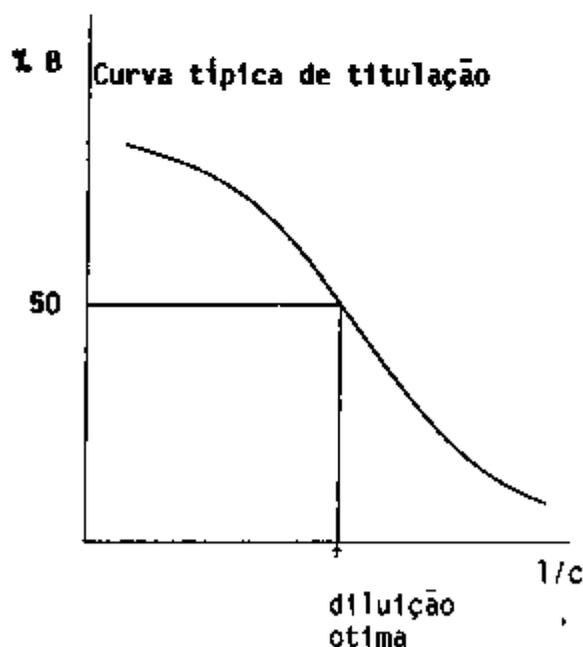
CARACTERIZAÇÃO DOS ANTI-SOROS Compreende o estudo de 3 parâmetros fundamentais

- 1 Título
- 2 Especificidade
- 3 Sensibilidade

1 Título É definido como a diluição do anti-soro que se liga a 50% da radioatividade do antígeno marcado. Título ou concentração do anticorpo tem importância secundaria para o radioimunoensaio pois informa somente a quantidade e não a qualidade do anticorpo. O requisito essencial e que ele seja suficientemente alto para permitir um grande numero de testes. A estimativa do valor do título do anticorpo e normalmente obtida pela curva de titulação do anticorpo. Quantidades constantes do antígeno marcado são incubados com diferentes diluições do antisoro e a distribuição da radioatividade entre antígeno ligado e livre e determinada

após a separação. A percentagem de ligação versus diluição do anticorpo é conhecida como TITULAÇÃO DO ANTICORPO ou CURVA DE DILUIÇÃO. Esta curva de titulação indica a diluição do anticorpo a ser usado nos ensaios, ou seja, a diluição ótima de anticorpo que apresenta 50% de ligação com o antígeno marcado (Ag^*) na ausência do antígeno não marcado (Ag), isto é, até que se obtenha uma relação $B/F = 1$. A representação gráfica, percentagem de ligação do anticorpo ou curva de diluição, mostra nas diluições em série uma diminuição na percentagem de ligação ao antígeno marcado. É escolhida a diluição que apresentar de 40 a 60% de ligação ao antígeno marcado no sistema de radioensaio adotado. Emprego de excesso de anticorpo resulta na queda da sensibilidade.

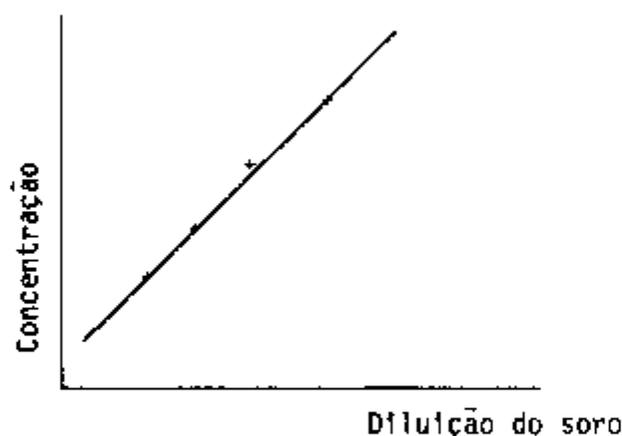
O gráfico a seguir representa uma curva típica de titulação em termos de percentagem de ligação em função do inverso da diluição do anticorpo.



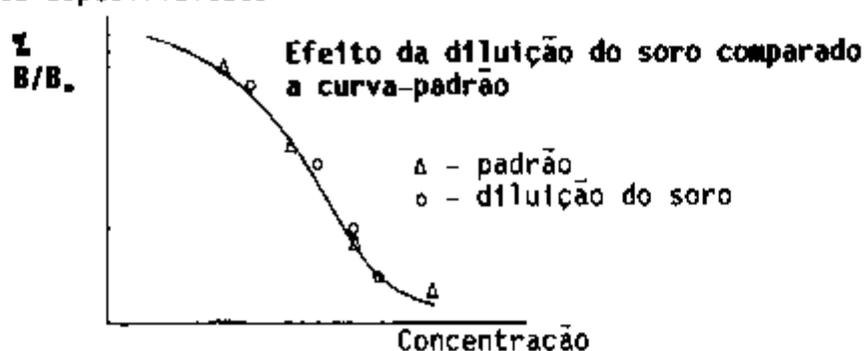
2 Especificidade Como o radioensaio baseia-se na competição entre antígeno marcado (Ag^*) e não marcado (Ag) para se unirem a um número limitado e específico de sítios de ligação do anticorpo (Ab), qualquer substância que possa competir na fixação a este anticorpo, influir na quantificação da reação. A especificidade do anticorpo está relacionada com a sua capacidade de reconhecer apenas o antígeno a ser dosado, usado para produzi-lo.

TESTES DE ESPECIFICIDADE Efeito da determinação hormonal endógena Faz-se a comparação entre os resultados provenientes da dosagem de uma mesma amostra de soro, com alto teor hormonal, em diferentes diluições. Calculam-se as médias das concentrações correspondentes a cada diluição. Calcula-se a correlação linear entre os volumes da amostra e a média dos valores encontrados obtendo-se a reta de regressão linear. A linearidade comprova a inexistência de fator sérico interferente, sendo portanto uma prova da especificidade do sistema.

Controle da especificidade Efeito da diluição do soro



As concentrações resultantes transferidas para a curva-padrão coloca em evidência possíveis fatores interferentes. Os pontos obtidos pela diluição do soro encontram-se muito próximos aqueles obtidos pelo uso de soluções padrão, praticamente se sobrepondo ao traçado da curva-padrão típica em termos de (% B/B₀) versus logaritmo de dose. A distribuição dos pontos quando transferidos para a curva-padrão revela o comportamento idêntico dos soros e soluções-padrão validando a eficácia da técnica da especificidade.



3 Sensibilidade (afinidade e avidéz) Um requisito para um radioimunoensaio sensível é um anticorpo que tenha interação elevada com o antígeno que se reflete essencialmente na queda inicial da curva-padrão. Quanto melhor o ângulo desta com a ordenada, maior a sensibilidade. Com efeito, quanto maior for a inclinação da curva no seu trecho inicial, correspondendo aos menores valores de massa do antígeno, maior será a variação da relação B/F.

AFINIDADE Se refere à forte atração entre o antígeno e o anticorpo.

SENSIBILIDADE A habilidade em detetar variações na concentração do substrato depende da interação antígeno-anticorpo. A reação entre antígeno e os sítios de combinação do anticorpo é a sensibilidade do anticorpo e uma função da constante de afinidade que é definida como o recíproco da concentração molar do antígeno livre a meia saturação do anticorpo, ou seja, diluição do anticorpo a 50% de ligação na presença de pequena concentração do traçador. A constante de afinidade K deve ser suficientemente alta para que sejam sensíveis na faixa de interesse. A afinidade da reação depende do tempo de imunização. Não se requer a medida de K ou outros parâmetros de reação imunológica para seleccionar um anticorpo. É necessário somente testes de diluição em torno de 50% de ligação ou relação B/F = 1.

AVIDEZ É a medida da integridade do complexo antígeno-anticorpo formado. Os soros individuais preparados contra determinado antígeno, especialmente antígeno protéico, muitas vezes difere em avidéz, isto é, em sua capacidade de combinar e formar complexos estáveis com o antígeno. Estas diferenças podem ser demonstradas por diluição das misturas antígeno-anticorpo. Nessas condições as concentrações do antígeno e do anticorpo livres ficam diminuídas, resultando em dissociação dos complexos imunes. A dissociação é menos intensa em anti-soros mais avidos. A sensibilidade do ensaio depende também da atividade específica do antígeno marcado (Ag^*), ou seja, quanto maior a atividade específica maior a possibilidade de diluição do anti-soro para se obter 50% de ligação. O anti-soro não diluído é aliquotado e estocado em congelador por mais de uma década sem perda da potência. Rotineiramente preparam-se 50 ml de solução estoque 1:1 000 em solução salina adicionando 100 µl de soro de coabata para inibir perdas de anticorpo por adsorção ao frasco e mertiola-

to 1 5 000 como conservante. A solução estoque é guardada em geladeira e usada para várias diluições por muitos anos. Este é um anticorpo policlonal. Em algumas situações seria desejável que em lugar de um anticorpo policlonal pudessemos trabalhar com um anticorpo monoespecífico produzido por um único linfócito, ou clone dele derivado, ou seja, um anticorpo monoclonal.

3 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Em princípio a produção de anticorpos monoclonais poderia ser alcançada pelo isolamento e cultura de clone. Na prática esse processo é inviável pois os linfócitos B são células que não se mantêm em cultura por mais de alguns dias.

Em 1975 Kohler e Milstein encontraram uma forma original para contornar o problema. Em lugar de cultivar linfócitos promoveram a fusão dos linfócitos B com células neoplásicas de mieloma. As células híbridas resultantes, denominadas hibridomas, possuem as mesmas características das células parentais, sintetizam anticorpos e mantêm-se em cultura por tempo indeterminado.

CÉLULAS NEOPLÁSICAS DE MIELOMA São células malignas e crescem em cultura de tecido. Possuem todos os maquinismos sintéticos necessários à tradução da informação genética dos linfócitos B. Se prestam ao cultivo mas secretam grande quantidade de imunoglobulinas, ou seja, anticorpos, exatamente por serem linfócitos B. Estes anticorpos são monoclonais, pois resultam da proliferação e secreção de um único clone de células. Não possuem especificidade identificável, certamente não para o antígeno de interesse são monoclonais para os quais o linfócito que sofreu transformação neoplásica estava programado. Recentemente conseguiu-se mutantes desses mielomas que não secretam anticorpos. São linfócitos neoplásicos não produtores. Sobrevivem em cultura e são usados na fusão celular com linfócitos não neoplásicos. Três linhagens de mieloma, derivadas de camundongo, são normalmente usadas. Essas linhagens de células mutantes já estão estabelecidas em cultura. São linfócitos neoplásicos não produtores usados na fusão celular com linfócitos não neoplásicos. A fusão celular resulta na produção de anticorpos que possuem somente as características dos linfócitos não neoplásicos. As células de mieloma atuam como um fator da expressão da informação genética das células do animal imunizado, não contribuem com nenhuma porção do anticorpo.

LINFÓCITOS NÃO NEOPLÁSICOS Os linfócitos imunes são obtidos através da imunização em animais de laboratório por técnicas imunológicas convencionais. Para a obtenção de anticorpos com a especificidade e título de

sejados, imunizam-se varios animais, camundongos da linhagem isogênica BALB/c ao mesmo tempo. Os camundongos são injetados intraperitonealmente com o antígeno em adjuvante completo de Freund em intervalo de 3 semanas, seguidas de uma injeção intravenosa 3 dias antes de realizar a fusão celular, isto porque as células em fase de crescimento logarítmico (multiplicação ativa) fornecem uma fonte de células em um estado metabólico altamente reprodutível. É necessário sincronizar a fusão com o máximo de proliferação das células formadoras de anticorpos. O desenvolvimento da resposta imune dos animais injetados pode ser apreciada testando-se o soro do animal por diferentes técnicas (imunoensaio ELISA, imunofluorescência, radioimunoensaio) levando-se em conta as facilidades operacionais. A resposta imune do animal é policlonal. Selecionam-se os melhores respondedores. Alguns destes animais assim selecionados servirão a produção de anticorpo policlonal. Outros serão empregados nos experimentos de fusão celular.

FUSÃO CELULAR Em condições estéreis o animal imunizado é sacrificado, seu baço removido e dele é preparada uma suspensão de células ricas em linfócitos imunes. Após misturar estas células com as de mieloma, utiliza-se polietilenoglicol (PEG) para a fusão celular. Acontece que os eventos da fusão celular são incontrolláveis. Poderão fundir-se linfócitos com linfócitos, mieloma com mieloma e linfócitos com mieloma. Algumas células de linfócitos e de mieloma não se fundirão. As células híbridas de interesse, LINFOCITO-MIELOMA são selecionadas através do cultivo. As células híbridas linfócitos com linfócitos e os linfócitos que não se fundiram não crescem em cultura e são automaticamente eliminadas. Os híbridos mieloma com mieloma que não se fundiram são eliminados através do cultivo em meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). Isto acontece porque a célula para se reproduzir deve sintetizar uma molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico). A síntese do DNA é feita por 2 vias metabólicas: *via de novo* e *via de salvação*. Para a síntese de DNA pela *via de salvação* é necessário o enzima HGPRTase (hipoxantina guanina fosforribosil transferase) codificado por um gene localizado no cromossoma X. Mielomas mutantes tem mutações exatamente neste gene de modo que não possuem o enzima HGPRTase e só podem sintetizar o DNA pela *via de novo*. Ocorre que a aminopterina, um

dos componentes do meio seletivo HAT tem a propriedade de inibir a síntese de DNA pela via *de novo*. Sendo geneticamente incapazes de sintetizar o DNA pela via *de salvação* e estando a via *de novo* bloqueada pela aminoptericina as células de mieloma desaparecem da cultura. Como os genes dos linfócitos possibilitam a formação de HGPRTase normal, embora a via *de novo* esteja bloqueada a síntese do DNA pode ser feita pela via *de salvação* assim os híbridos LINFÓCITOS-MIELOMA são as únicas células a sobreviverem. Desta forma na cultura restarão apenas os híbridos LINFÓCITOS-MIELOMA. Muitos híbridos não produzirão anticorpos porque das fusões ao acaso pode ficar excluído do híbrido os cromossomos dos linfócitos responsáveis pela codificação dos anticorpos. Outros híbridos produzirão anticorpos das mais diversas especificidades contra quaisquer antígenos a que o camundongo fornecedor de linfócitos imunes tenha sido exposto em sua vida. Apenas uma parcela de híbridos produzirá anticorpos contra o antígeno desejado. Portanto entre os milhares de híbridos é necessário separar apenas os híbridos produtores de anticorpos contra o antígeno desejado.

SELEÇÃO DE HÍBRIDOS PRODUTORES DE ANTICORPO DESEJADO Deixa-se a suspensão de células fundidas crescerem por um certo período para que os híbridos se multipliquem aumentando a sua população. Ressuspende-se a cultura em meio de cultivo para obter uma suspensão extremamente diluída. Amostras desta suspensão são distribuídas em placas de plástico contendo 96 poços. Após o desenvolvimento das colônias nos poços testa-se o sobrenadante dos hibridomas para avaliar a presença de anticorpos de interesse. Testes disponíveis: imunoenzimático ELISA, imunofluorescência e radioimunoensaio. Identificados os poços que contêm hibridomas positivos para a produção do anticorpo de interesse faz-se a clonagem por diluição limitante, ao nível de uma única célula, observável em microscópio invertido. Obtendo-se um poço com uma única célula todas as células oriundas da sua multiplicação pertencerão a um mesmo clone. Os clones originados da célula produzirão anticorpos monoclonais. Selecionam-se os melhores clones. A quantidade de anticorpos de um poço é mínima mas usando-se técnicas de laboratório apropriadas pode ser ampliada *in vitro* pela cultura de tecido convencional ou *in vivo* por inoculação na cavidade peritoneal de camundongos isogênicos BALB/c. Esses hí-

bridos, sendo células neoplásicas se multiplicarão na cavidade como se fossem tumores, mielomas, e secretarão anticorpos para a cavidade (fluido ascítico)

A principal diferença entre o método de produção *in vitro* (cultura de tecido) e o método *in vivo* (camundongos isogênicos BALB/c) é a maior concentração de anticorpo monoclonal *in vivo*

Embora a produção de anticorpos monoclonais por fluido ascítico (*in vivo*) seja lenta, de alto custo e ser o sistema por cultura de tecido (*in vitro*) na produção de agentes biológicos uma atraente possibilidade para produção de anticorpos monoclonais em larga escala, até o momento o uso de fluido ascítico (*in vivo*) para produção de anticorpos monoclonais, a partir do híbridoma, continua sendo o procedimento de escolha para a produção em larga escala. O maior fator limitante para este tipo de produção é a necessidade de um número elevado de camundongos pois o pequeno tamanho do animal e conseqüentemente o pequeno volume de fluido ascítico obtido por camundongo (2-5 ml) exigem espaço e cuidados muito especiais com o animal

O fato de ser essa produção laboriosa e de alto custo é importante efetuar controles de qualidade para a segurança de um bom e consistente fluido ascítico rico em anticorpo monoclonal. Torna-se necessário monitorar a qualidade das CÉLULAS DE HÍBRIDOMA e as COLONIAS DE CAMUNDONGOS usados no processo de produção

CÉLULAS DE HÍBRIDOMA Um requisito essencial para a produção de anticorpos monoclonais é a obtenção de um clone de células secretoras de anticorpo estável utilizando células que tenham sido clonadas 2 a 3 vezes. É vantajoso também o uso de clones que produzam larga quantidade de anticorpo. Sempre que possível esta característica deve estar entre os critérios para a seleção da população original das células fundidas. Uma vez selecionado um clone, as células precisam crescer *in vitro* por algumas semanas e serem caracterizadas extensivamente. Embora os híbridos sejam *imortais* e de boa prática monitorar cuidadosamente a idade das células *in vitro*. A secreção do anticorpo pode ser caracterizada bioquimicamente para garantia de que o clone permanece consistente e geneticamente estável. As análises incluem caracterização eletroforética da secreção de imunoglobulinas assim como a reconfirmação da classe ou

subclase da imunoglobulina. As células de híbridoma usadas na produção de anticorpos monoclonais precisam ser também monitoradas, rotineiramente, quanto a presença de contaminantes que não podem ser detectados microscopicamente como micoplasma (os menores organismos de vida livre) e viroses do camundongo.

COLONIAS DE CAMUNDONGOS Outro ingrediente essencial para a obtenção de um bom anticorpo monoclonal, contido no fluido ascítico, é a saúde do camundongo usado. Somente os camundongos BALB/c isogênicos são considerados adequados. Adequado significa uma procriação cuidadosa de camundongos de uma colônia cuja composição genética seja rotineiramente monitorada. Significa também camundongos saudáveis, livres de ecto e endoparasitas, viroses e bactérias patogênicas. O tamanho e a idade do camundongo precisam ser cuidadosamente considerados. Animais de 6 a 8 semanas pesando de 15 a 20 g são os de escolha. Os animais muito novos, além de pequenos, não estão inteiramente imunocompetentes o que impede a monitoração da presença de anticorpo contra patogêneses no seu soro. Embora não haja diferenças genéricas entre camundongos machos e fêmeas, as fêmeas são preferidas por apresentarem menor agressividade no seu território.

PROCEDIMENTOS IMUNOQUÍMICOS O desenvolvimento da TECNOLOGIA DE HIBRIDOMA e a subsequente disponibilidade de anticorpos monoclonais contra um único determinante antigênico de alguns antígenos associados a tumor revitalizou a ideia do seu uso *in vivo* como reagentes imunológicos na identificação de antígenos tumorais. É óbvio que antes da sua aplicação clínica é necessário que se realize alguns procedimentos imunológicos para cada anticorpo monoclonal como uma contribuição preliminar para sua aplicação específica em imunocintigrafia.

constam desses procedimentos

- 1 Purificação de anticorpos monoclonais para isolar a fração de imunoglobulina IgG
- 2 Redução da molécula de IgG purificada
- 3 Estudos analíticos por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

4 PROCEDIMENTOS IMUNOQUÍMICOS (Metodologia)

1 Purificação de anticorpos monoclonais procedimentos usados

O conhecimento da classe e subclasse do anticorpo e de grande valia para a escolha do sistema de purificação. Um modo simples para determinar a classe de anticorpo e via ANÁLISE OUCHTERLONY, difusão dupla radial) com formação de linha de precipitação no agar. No poço central coloca-se solução contendo a imunoglobulina e nos poços periféricos classe específica de anti-soro anti-imunoglobulina (Meloy, Nordic ou outros fornecedores). Alternativamente, a classe de anticorpo pode ser determinada por radioimunoensaio, ligação enzimática ELISA ou imunofluorescência indireta com classe específica de anticorpos fluorescentes.

A descrição dos processos de purificação concentra-se nas IgG e IgM, as classes encontradas com mais frequência. Afortunadamente a IgG, anticorpo mais comum, e também o mais fácil de se purificar.

Os anticorpos monoclonais podem ser purificados por uma variedade de procedimentos:

- 1- Precipitação com sulfato de amônio
- 2- Precipitação com ácido caprílico
- 3- Cromatografia de troca iônica
- 4- Gel filtração
- 5- Afinidade cromatográfica em Proteína A-Sepharose

1- Precipitação com sulfato de amônio

É um método antigo e muito usado na purificação de imunoglobulinas. Tem como base a precipitação dessas moléculas, que outras proteínas séricas, com o sulfato de amônio. A precipitação de imunoglobulinas por sulfato de amônio, apesar de efetiva e simples, apresenta alguns pontos técnicos que podem influenciar fortemente o grau de purificação obtida. De preferência adiciona-se lentamente a solução aquosa de sulfato de amônio saturada para evitar que uma concentração local alta provoque precipitações indesejáveis de proteínas, como a albumina, diminuindo assim o grau de purificação. O soro a ser fracionado e colocado em recipiente com agitador magnético. A agitação deve ser lenta para não denaturar a proteína. A solução de sulfato de amônio saturada e

adicionada gota a gota e cada gota deve ser dispersa antes da adição da próxima. Quando a concentração de sulfato de amônio alcança cerca de 20% de saturação o soro começa a se tornar leitoso. A maioria das imunoglobulinas podem ser purificadas por 35-40 % de saturação ainda que ocasionalmente possa ser necessário 50% de saturação. Concentrações altas, além de não aumentarem o rendimento das imunoglobulinas, podem causar aumento de concentração por outras proteínas especialmente a albumina. Após agitação lenta de 15-30 minutos a suspensão é centrifugada a 2 000g. O precipitado é lavado 2 a 3 vezes com sulfato de amônio a 50% de saturação para reduzir a contaminação com proteínas não imunoglobulinas. Finalmente o precipitado é dissolvido em PBS (tampão fosfato salina). Como os íons de amônio podem interferir com procedimentos subsequentes são removidos por dialise (*overnight*) contra 500-1 000 volumes de PBS.

2- Precipitação com ácido caprílico

A adição de ácido caprílico ao soro pode precipitar muitas proteínas sem afetar a IgG podendo assim ser um meio eficiente para a purificação dessa molécula. A adição do ácido caprílico ao fluido ascítico, gota a gota com agitação constante, resulta na formação de um precipitado. Após centrifugação são encontrados no sobrenadante cerca de 20 a 40% de concentração protéica do material inicial. O sobrenadante é filtrado em filtro Millipore 0,45µm e dializado a 4°C em PBS. A recuperação de IgG determinada por radioensaio é de 60 a 80%. O título do anticorpo no sobrenadante, medido por ensaio de ligação, é cerca de 2 vezes maior que no material inicial. A eletroforese em gel de poli-acrilamida duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para proteína fria e radioiodada mostram que os maiores componentes são as cadeias pesada e leve de IgG. A precipitação pelo ácido caprílico para purificar anticorpo é rápida e simples como a precipitação com sulfato de amônio. A sua maior vantagem está na menor formação de agregados quando comparada ao método de precipitação com sulfato de amônio.

ASSOCIAÇÃO DOS 2 SISTEMAS DE PRECIPITAÇÃO

O sobrenadante obtido após precipitação com ácido caprílico é filtrado e esfriado a 4°C. Sempre a 4°C, adiciona-se lentamente e sob agitação constante, solução de sulfato de amônio 27,7%. Após centrifugação despreza-se o sobrenadante e o precipitado é ressuspendido apro

ximadamente a 1/10 do volume inicial de ascite. Procede-se a dialise, *overnight*, contra PBS.

3- Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica é um método de purificação de imunoglobulinas muito usado experimentalmente para a purificação de IgG. Uma coluna de 10 ml pode manipular facilmente 100 a 200 mg de proteína. As resinas de troca iônica modernas são de baixo custo, fáceis e simples na sua preparação. O tamanho da camada de resina será determinado pela massa de proteína a ser ligada. O modelo da coluna não é importante. Preparam-se colunas adequadas com seringas de plástico descartáveis. As imunoglobulinas são em geral suficientemente resistentes à ação de proteases e a cromatografia de troca iônica pode ser realizada a temperatura ambiente.

4- Gel filtração

É a técnica de separação de moléculas de tamanhos diferentes pela passagem em coluna de gel. Gel filtração separa as proteínas de acordo com o peso molecular. As moléculas maiores, por exclusão, movem-se rapidamente sendo eluídas em primeiro lugar. É um procedimento simples com capacidade de boa recuperação, entretanto, resulta numa grande diluição da amostra e um fator menor de purificação que a troca iônica ou afinidade cromatográfica. O sistema de gel filtração na purificação de IgG funciona mais como auxiliar para outros métodos quando se faz necessário um elevado grau de purificação. No entanto tem um papel importante na purificação de IgM.

SELEÇÃO DE GEL ADEQUADO

A utilidade dos géis cresceu enormemente nos últimos anos. Os principais tipos são dextran granulado (Sephadex), acrilamida (Bio-gel P), agarose (Sephacryl-Bio-gel A) e várias combinações desses géis. Sephacryl é uma mistura de dextran e acrilamida. Sephacryl e Ultrogel são muito mais resistentes para compressão, fáceis para o empacotamento e são fornecidos com pré-intumescimento. Sephadex é fornecido como um pó seco precisa ser intumescido, antes do uso, em grande quantidade de água. Gel filtração de imunoglobulina pode ser feita a temperatura ambiente. A resolução em gel filtração é criticamente dependente de um bom preparo da coluna.

Géis adequados para separação de imunoglobulinas e seus fragmentos

Imunoglobulina	Peso molecular	Gel filtração
IgG	150 000	Sephacryl S-300 (Pharmacia)
IgM	900 000	Sepharose 6B (Pharmacia) Sephacryl S-500 (Pharmacia) Ultroge1 AcA22 (LKB)
Fragmento Fab	50 000	Sephadex G-100 (Pharmacia)
Fragmento F(ab) ₂	100 000	Sephacryl S-200 ou S-300 (Pharmacia)

5- Afinidade cromatografica em Proteína A-Sepharose

É um dos métodos mais usados na purificação de anticorpos monoclonais. Apesar de necessitar de equipamento especial como coletor de frações monitorado com ultra violeta e acessórios este é um equipamento padrão que a maioria dos laboratórios bioquímicos possui. É método de escolha para purificação de subclasses apropriadas de IgG (IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃). A proteína A é uma proteína produzida por linhagens de *Staphylococcus aureus*. A proteína A é ligada covalentemente a Sepharose (Proteína A-Sepharose).

Condições para ligação da proteína A-Sepharose

IgG subclasses	Especies	Ligação	Eluição
IgG ₁ *	camundongo	pH > 8,0	pH < 6,0
IgG _{2a}	camundongo	pH > 7,0	pH < 4,5
IgG _{2b}	camundongo	pH > 7,0	pH < 3,5
IgG ₃	camundongo	pH > 7	pH < 4,5
IgG ₁	rato	Ligação fraca e variavel pH 8,0	
IgG _{2c}	rato	Ligação fraca e variavel a pH 8,0	
IgG _{2b}	rato	Ligação muito fraca a pH 8,0	
IgG _{2c}	rato	pH > 7,0	

* Por apresentar ligação frequentemente baixa e variavel, esta tecnica não é recomendada para IgG₁ (camundongo). Recentemente, porém, Bio Rad produziu um novo sistema para purificação de IgG₁ (camundongo) em Proteína A-Agarose. Desde que muitos anticorpos monoclonais são IgG₁ este sistema pode tornar-se bastante popular.

O fracionamento de anticorpos monoclonais por afinidade cromatografica oferece excelente purificação mesmo que a amostra esteja muito eluída. A recuperação da proteína é independente do volume da amostra. A principal desvantagem da afinidade cromatografica é o seu alto custo, porém como as colunas de afinidade podem ser usadas repetidamente (40-60 vezes) sem deterioração ou mudança nas propriedades de ligação, o custo por separação diminui com o aumento do uso. O anticorpo monoclonal individualmente possui propriedades diferentes e é improvável que as mesmas condições de ligação e eluição sejam aplicáveis a todos os casos. É importante examinar as condições de ligação e eluição para cada anticorpo individualmente.

Coluna de afinidade cromatografica para anticorpos pode ser dividida em 4 fases importantes: pre-ciclagem, ligação, lavagem e eluição.

A afinidade cromatografica em Proteína A-Sepharose é preferida pela alta capacidade de ligação, condições de eluição e disponibilidade comercial. A concentração da IgG é determinada espectrofotometricamente pela absorbância específica da solução a 280 nm usando 1% p/v, $1 \text{ cm} = 14$.

Em situações nas quais o anticorpo monoclonal não se liga a Proteína A usa-se outro sistema de purificação.

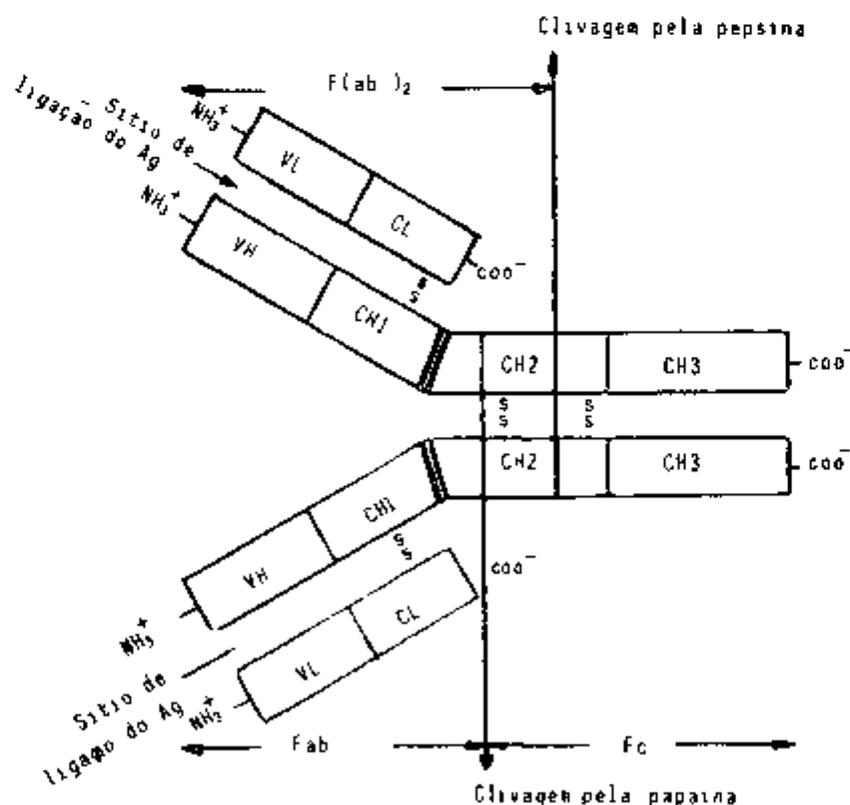
2 Redução da molécula de imunoglobulina (IgG) purificada

Todas as classes de imunoglobulinas são representadas por um modelo básico constituído de duas cadeias polipeptídicas leves L (*light*) de peso molecular aproximadamente de 23 000 daltons e duas cadeias pesadas H (*heavy*) com peso molecular variável entre 50 000 a 75 000 daltons, dependendo da classe a que pertence o anticorpo. Qualquer classe de imunoglobulina pode ser utilizada para o estudo da estrutura porque em todos os casos o mecanismo básico de ligação molecular entre antígeno e anticorpo é o mesmo. IgG por sua maior concentração no soro e fácil obtenção foi a classe de imunoglobulina mais estudada. Uma globulina da classe IgG com peso molecular = 150 000 daltons é constituída de 4 cadeias peptídicas ligadas entre si por pontes dissulfídicas. Das 4 cadeias, duas são maiores e por isto chamadas cadeias pesadas H (*de heavy*) e duas menores leves L (*de light*). Além disso existem ainda ligações dis

sulfídicas intracadeias. Cada cadeia leve e cada cadeia pesada contem uma região constante na sequência de aminoácidos, característica de cada espécie, chamada de região C. Cada cadeia tem também uma região V onde a sequência de aminoácidos parece ser diferente para cada anticorpo específico. As regiões constantes das cadeias pesadas possuem 3 domínios distintos CH_1 , CH_2 , CH_3 . Cada cadeia possui uma porção aminoterminal e a oposta e carboxiterminal. Nas porções aminotermiais de cada célula de IgG estão os sítios de combinação específicos para o determinante antigênico que induziu sua síntese.

Os anticorpos monoclonais e subclasses de imunoglobulinas IgG são utilizados *in vitro* em uma variedade de ensaios imunológicos e *in vivo* como agentes diagnósticos e terapêuticos. Em muitos casos é necessário a preparação de fragmentos Fab e $F(ab)_2$ de anticorpo para o seu uso como agente imunológico.

Esquema da estrutura e hidrólise da molécula de IgG



A digestão enzimática com pepsina remove parte da região constante da IgG para produzir um fragmento $F(ab)_2$. A digestão enzimática com papaina fraciona a molécula em 2 fragmentos Fab e um fragmento Fc intacto. A separação dos fragmentos pode ser efetuada por cromatografia de afinidade proteína A-Sepharose e cromatografia de troca iônica.

Usando tratamento enzimático a molécula de IgG pode ser quebrada em várias partes produzindo o que se convencionou chamar de fragmentos de imunoglobulina. A hidrólise enzimática tem sido usada por muitos anos para análise imunoquímica de imunoglobulinas, principalmente para caracterização de subclasses de IgG. Mais recentemente o desenvolvimento da tecnologia de hibridoma e o uso de anticorpos monoclonais produzidos em camundongos, de especificidade e subclasse definidas, tornou-se particularmente significativo o conhecimento detalhado desta análise. A maioria dos anticorpos monoclonais pertencem a uma das subclasses de IgG e em muitos casos a preparação dos fragmentos por clivagem proteolítica de IgG é necessária para o seu uso como reagentes imunológicos em vários contextos clínicos. Devido ao fato dos anticorpos monoclonais serem produzidos em camundongos BALB/c isogênicos pois até o momento, embora com progressos neste sentido não se conseguiu a linhagem humana adequada aos experimentos de fusão como as linhagens de camundongos, a sua administração em pacientes pode resultar na formação de anticorpos anti-murino. Quando se injeta anticorpo de uma espécie animal em outra esta última o reconhece como substância estranha, ou seja, como um antígeno e contra ele produzirá anticorpos anti-idiotípicos porque reconhecem o idiótipo (porção do anticorpo - anticorpo I- que contém os sítios de ligação do antígeno) produzindo reações hipersensíveis. Estas reações porém, não constituem fator limitante para a aplicação desses reagentes imunológicos pois as ligações inespecíficas e respostas alérgicas, via região Fc, são evitadas com a remoção deste fragmento.

As condições ótimas usadas para geração de fragmentos ativos de anticorpo, Fab ou F(ab)₂, variam de espécie para espécie e dependem da espécie animal usada e da subclasse específica de IgG que é digerida.

CLIVAGEM PAPAÍNICA (Stanworth e Turner, 1978)

Papaína é uma protease triol, isto é, possui um grupo SH necessitando assim da presença de um agente redutor para a sua ativação. A ação redutiva sobre as partes dissulfídicas e extensão desses efeitos depende do agente redutor e da sua concentração. A digestão de IgG pela papaína fraciona a molécula de IgG em 3 fragmentos, 2 designados fragmentos Fab e o outro fragmento Fc. Os fragmentos Fab são possuidores da atividade específica do anticorpo. O fragmento Fc intacto não tem capaci-

dade de se ligar a antígenos mas possui propriedades químicas que lhe permite desempenhar importantes funções biológicas podendo ativar varios componentes do sistema imunológico

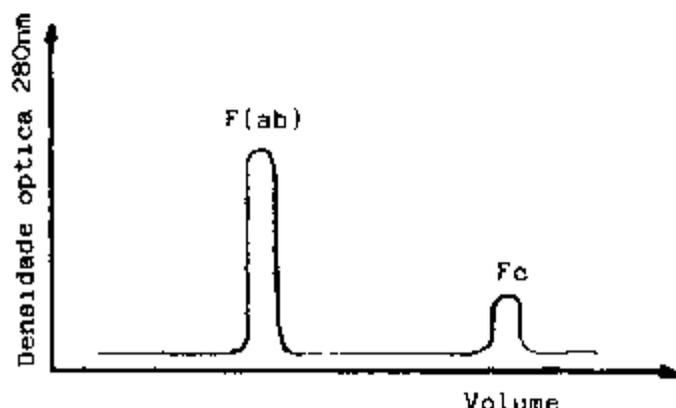
CLIVAGEM PEPSÍNICA (Lamoyi e Nisonoff, 1983)

Pepsina é uma protease não específica que é ativada somente em pH ácido e é denaturada de forma irreversível a pH neutro ou alcalino. A digestão peptica de imunoglobulinas é largamente usada para a preparação de fragmentos bivalentes de anticorpos IgG porém sem a região Fc. Não há necessidade de usar redutores. A produção de fragmentos $F(ab)_2$ de anticorpos monoclonais é conveniente pois estes fragmentos contêm 2 sítios de ligação ao antígeno. A preparação de fragmentos $F(ab)_2$ varia de acordo com a subclasse de IgG.

Após a purificação da imunoglobulina, por técnicas convencionais, a hidrólise enzimática é desenvolvida em diferentes tempo, pH, razão enzima-substrato para as diferentes subclasses de IgG. Isto enfatiza a necessidade de estudos preliminares de cada IgG que é submetida a digestão peptica. Os fragmentos $F(ab)_2$ na preparação são separados da IgG intacta por proteína A-Sepharose e cromatografia de troca iônica.

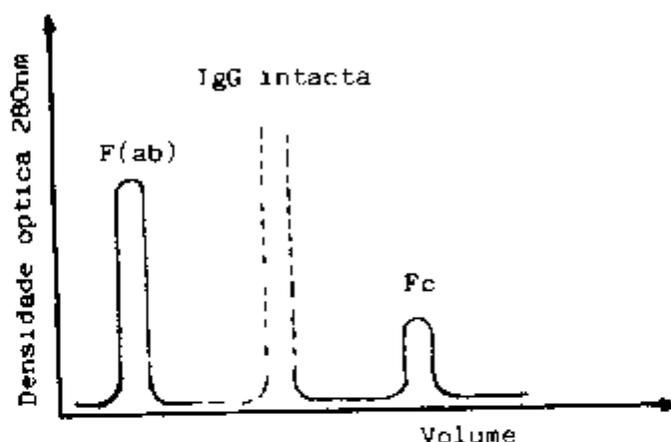
SEPARAÇÃO EM PROTEÍNA A-SEPHAROSE

No caso de subclasses de IgG com forte afinidade para proteína A o material digerido é aplicado a coluna de proteína A-Sepharose. Os fragmentos Fab passam através da coluna enquanto que Fc e IgG não digerida ficam ligados. O fragmento $F(ab)_2$ é gotejado através da coluna. Após retorno a linha basal o Fc e IgG não digerida são eluídos com tampão adequado.



SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Metodo de escolha para as subclasses de IgG que não se ligam a proteína A. O material digerido e passado através da coluna de DEAE-celulose. O fragmento Fab geralmente mais básico que Fc e IgG intacta e eluído em primeiro lugar seguido pela IgG que não digeriu e finalmente Fc.



3 Estudos analíticos por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para a garantia de sucesso aos experimentos futuros a pureza da imunoglobulina (IgG) e seus fragmentos, assim como a digestão enzimática da IgG, são monitoradas por SDS-PAGE. A técnica de SDS-PAGE é largamente usada na separação de proteínas e tem como preceito a comparação da modalidade eletroforetica de proteínas padrão de peso molecular conhecido com amostras de pesos moleculares desconhecidos. Entre os vários sistemas de SDS-PAGE descritos o mais comumente usado é o sistema descontínuo introduzido por Laemmli em 1970 para eletroforese em disco, adaptado posteriormente (Studier, 1973) para eletroforese em placa. Este sistema é caracterizado por uma descontinuidade no pH do tampão e no tamanho do poro do gel de poliacrilamida. Os reagentes essenciais em toda aplicação de gel de poliacrilamida são acrilamida, bis-acrilamida, persulfato de amônio e TEMED (tetrametileno diamina).

SISTEMA PERSULFATO DE AMÔNIO

TEMED é usado para a polimerização do gel de poli(acrilamida). A polimerização só ocorre após a adição de um iniciador (persulfato de amônio) e um catalizador (TEMED). O TEMED cataliza a formação de radicais livres e o persulfato de amônio por sua vez inicia a polimerização. Neste sistema são preparados 2 tipos de gel: o **stacking gel** com poros grandes e pH 6,8 onde a amostra é concentrada e o **running gel** com poros pequenos e pH 8,8 onde as amostras são separadas em seus componentes. O tamanho dos poros do **running gel** é influenciado pela concentração da acrilamida na mistura de polimerização. O tamanho do poro do gel diminui com o aumento da concentração de acrilamida. Concentrações altas de acrilamida (10-12%) são usadas na separação de proteínas de peso molecular baixo. Concentrações mais baixas de acrilamida (5-6%) são usadas para separação de proteínas de peso molecular alto. O tamanho do poro do **running gel** pode ser ajustado conforme a heterogeneidade do peso molecular da amostra. A maior vantagem deste sistema está no fato de as amostras serem concentradas através dos poros grandes do **stacking gel**. A simplicidade e velocidade do método e o fato de se poder usar amostras de proteínas a nível de microgramas torna o SDS-PAGE método de escolha para a determinação da complexidade e dos pesos moleculares dos constituintes polipeptídicos na amostra de proteína.

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS AO DESENVOLVIMENTO DO SDS-PAGE

Consistem de

- 2 reservatórios (inferior e superior) para soluções tampão
- 1 par de placas de vidro. Uma das placas possui uma chanfradura na borda de cima
- 3 espaçadores de acrílico usados dos lados e na base das placas lacradas nas bordas com agar 3% derretido e unidas por 6 pinças
- O **running gel** é formado entre as 2 placas de vidro
- O espaçador, ao longo da base, é removido após a polimerização do gel de poli(acrilamida) e antes da eletroforese
- No **stacking gel** usa-se um pente de acrílico para moldar as pequenas fendas onde as amostras são aplicadas
- Seringas (microlitros) para colocar as amostras no **stacking gel**
- Pipetadores com ponteiros descartáveis

- bomba de vacuo

REAGENTES E SOLUÇÕES (Tabela 1)

Procedimento

- **Running gel** seleção da concentração de acrilamida (Tabela 2)
- **Stacking gel** (Tabela 3)
- Preparação da amostra (Tabela 4) Usa-se um sistema tampão com a finalidade de dissociar toda proteína em polipeptídeos, subunidades individuais. O agente de dissociação comumente usado é o detergente iônico dodecil sulfato de sodio (SDS). O complexo SDS polipeptídeo possui densidade de cargas idênticas e migram no gel de poliacrilamida de porosidade rigorosamente de acordo com o tamanho do polipeptídeo.
- Coloca-se o gel no reservatório inferior com a chanfradura voltada para frente tendo por cobertura o reservatório superior.
- Enche-se o reservatório inferior com tampão eletrodo. Algumas bolhas que aparecem entre as placas na base do gel são removidas com seringa e agulha arqueada.
- Enche-se o reservatório superior com tampão eletrodo.
- Promove-se a corrida eletroforetica (100 V corrente constante) a temperatura ambiente ate que a linha azul de bromofenol atinja a base do gel (4-5 hs). O eletrodo inferior é o anodo e o superior é o catodo.
- Desliga-se a corrente, remove-se o gel e descarta-se o **stacking gel**. Reserva-se o tampão eletrodo SDS usado no reservatório inferior para a proxima corrida.
- Coloca-se o **running gel** em recipiente contendo corante (0,2% de azul Coomassie para localizar as bandas de proteína). Decanta-se e guarda-se o corante para uso futuro.
- Descora-se o gel com solução descorante.

ANTICORPO POLICLONAL VERSUS ANTICORPO MONOCLONAL

Parece paradoxal tecer comentarios sobre anticorpo convencional apos o advento dos anticorpos monoclonais. Ambos, anticorpos poli e monoclonal, possuem propriedades específicas para uma situação particular. A natureza dessas diferentes propriedades precisam ser bem entendidas para o uso adequado desses anticorpos. É errado supor que os anticorpos monoclonais substituirão completamente a serologia convencion

nal. Frequentemente o esforço exigido não se justifica. Para alguns propósitos, com maior simplicidade na sua produção, o anticorpo convencional (policlonal) pode apresentar um bom desempenho. A especificidade do soro imune depende de milhares de produtos clonais que se ligam a determinantes antigênicos cobrindo a maioria da superfície do antígeno. Assim pequenas trocas na estrutura do antígeno não trará influências na sua ligação ao anticorpo. A produção de anticorpos monoclonais é consideravelmente trabalhosa, antes e após a fusão celular. Milhares de testes são feitos antes de se alcançar o clone imortal. A extrema monoespecificidade dos anticorpos monoclonais, ligação para um único sítio na molécula do antígeno, pode eliminar a capacidade ligante quando este sítio é alterado. Em alguns casos uma pequena modificação no anticorpo ou no antígeno pode suprimir completamente a ligação. Se o anticorpo monoclonal for usado na detecção de proteína no soro humano, pelas técnicas de radioimunoensaio, o menor polimorfismo genético nesta proteína ou de sua natureza compromete a ligação antígeno-anticorpo, enquanto que com o soro imune será mínimo este efeito.

Comparação entre soro imune (policlonal) e anticorpo monoclonal
(Strudler e Larson, 1988)

ÍTEM	SORO IMUNE (POLICLONAL)	ANTICORPO MONOCLONAL
Origem	Soro de animal imunizado	Celulas de hibridoma (linfócito-mieloma) de camundongo
Quantidade	Relativamente pequena. Utiliza-se um grande número de animais de laboratório	Praticamente ilimitada
Composição	Contem mistura de anticorpos com afinidade e correlação variando de animal para animal de sangue para sangue	Proteína homogênea monoespecífica
Vantagens	A sua produção é relativamente fácil	Produzido através de hibridoma. Alto grau de confiança e reprodutibilidade
Aplicação	Radioimunoensaio	Imunohistoquímica, imunodetecção, imunoterapia

Tabela 1

Reagentes e soluções para SDS-PAGE
(usa-se água bidestilada na preparação dos reagentes)

REAGENTES E SOLUÇÕES	PROCEDIMENTO
Solução A (Running gel) 30% acrilamida, bis-acrilamida (1:36)	30g de acrilamida 8g de bis-acrilamida para 100ml de H ₂ O Estocar a 4°C protegido da luz
Solução B Tampão running gel	Adicionar 18,2g de tris e 0,4g de SDS em 80ml de H ₂ O Titular com HCl 6N até pH 8,8 Completar o volume para 100ml de H ₂ O Estocar a 4°C
Solução C (stacking gel) 30% acrilamida bis-acrilamida (1:16)	30g de acrilamida, 1,6g de bis-acrilamida em 100 ml de H ₂ O Estocar a 4°C protegido da luz
Solução D Tampão stacking gel	Adicionar 6,06g de tris e 0,4g de SDS em 80ml de H ₂ O Titular com HCl 6N até pH 8,8 Completar o volume para 100 ml com H ₂ O Estocar a 4°C
SDS 20% SDS (duodecil sulfato de sódio)	20g de SDS em 100ml de H ₂ O A solução deve ser transparente e incolor E estavel a temperatura ambiente por varias semanas Precipita em geladeira
Persulfato de amonio 10%	20mg de persulfato de amonio em 1,0ml de H ₂ O Por ser instavel deve ser preparado exatamente antes do uso
TENE0 N,N,N',N'-tetrametileno	E estavel em solução não diluido a 4°C e em frasco escuro E usado como adquirido sem manipulação
Tampão eletrodo Tampão eletrodo	Adicionar 24g de tris e 115,2g de glicina em 900 ml de H ₂ O titular com HCl 6N até pH 8,5 Completar o volume para 1 000ml com H ₂ O Estocar a 4°C (Diluição 4x estoque e 0,1% SDS concentração final)
Tampão amostra solubilizante (amostra SDS)	Para 18,5ml de H ₂ O misturar 2,5ml de solução D 5ul de SDS 20% 2ml de glicerol 0,1ml de EDTA (0,1M em H ₂ O) Estocar pequenas aliquotas em congelador
Marcadores de peso molecular	Proteinas padrão disponiveis comercialmente Preparar-se as amostras de acordo com as especificações do produtor
Solução fixadora	50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acetico 40% (v/v) de H ₂ O
Solução corante	0,2% (p/v) Coomassie blue em solução fixadora
Solução descorante	10% (v/v) metanol 7% (v/v) ácido acetico, 83% de H ₂ O
Azul de bromofenol	0,1% (p/v) em H ₂ O

Tabela 2
Running gel

Os procedimentos tabulados abaixo fornecem volume suficiente para uma preparação (tamanho padrão)

Acrilamida %	5,0	8,0	10,0	12,5	15,0
Água bidestilada (ml)	11,7	9,7	8,4	6,7	5,1
Solução A (ml)	3,3	5,3	6,6	8,3	9,9
Solução B (ml)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Persulfato de amônio (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
As soluções são misturadas e o ar retirado a vácuo					
TEMED (µl)	20	20	20	20	20
Imediatamente após a adição de TEMED o running gel é rapidamente derramado entre as placas de vidro até cerca de 0,5 cm abaixo da chanfradura. O gel é então coberto com a água bidestilada.					

Tabela 3
Stacking gel

Os procedimentos tabulados abaixo fornecem volume suficiente de gel a ser polimerizado no topo do **running gel**

Água bidestilada (ml)	3,17
Solução C (ml)	0,50
Solução D (ml)	1,25
Persulfato de amônio (ml)	0,05
As soluções são misturadas e o ar retirado a vácuo	
TEMED (µl)	20
- Remover a cobertura (água bidestilada) do topo do running gel . Inserir o pente e preencher o espaço vazio com solução stacking gel . Após a polimerização o pente é cuidadosamente removido ficando expostos os poços para aplicação da amostra.	
Observação: A concentração de acrilamida no stacking gel é constante independentemente da concentração escolhida para o running gel .	

Tabela 4
Preparação da amostra

Amostras de soluções padrão são diluídas em tampão eletrodo e misturada com um volume adequado da mistura tabulada abaixo

MISTURA	μ l
Tampão amostra solubilizante (amostra SDS)	370
β -mercaptoetanol	10
Azul de bromofenol	20

- É necessário aquecer cada amostra a 100°C por 2 a 3 minutos
- Volume da amostra o volume máximo possível e determinado pelo tamanho dos poços de aplicação da amostra que é formado no **stacking gel**
- Normalmente são aplicados por poço 20 a 40 μ l da amostra contendo 2-20 μ g de proteína

Observação O tampão amostra solubilizante (SDS) pode ser preparado sem o β -mercaptoetanol se não houver necessidade de redução das pontes dissulfídicas das proteínas. O β -mercaptoetanol é usado para quebrar as pontes dissulfídicas

5 RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPOS E SEUS FRAGMENTOS

Para a sua aplicação em imunocintigrafia os anticorpos e ou seus fragmentos precisam ser radiomarcados. Na marcação de anticorpos monoclonais a escolha do radionuclídeo adequado é influenciada por muitos fatores tais como

- meia vida física e biológica
- natureza da radiação emitida
- atividade específica
- facilidade de introdução na proteína
- estabilidade do produto marcado
- caminho metabólico do radionuclídeo no organismo
- facilidade de detecção
- disponibilidade comercial e preço

A preparação de radiofarmacos depende de um sistema de marcação que conduza a uma ligação consistente com o radionuclídeo selecionado. Os anticorpos monoclonais quando ligados adequadamente a radioisótopos emissores α e β e em altas doses são usados na radioterapia. Especificamente certos radionuclídeos como ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{212}Bi , ^{211}At assim como várias metodologias usadas na ligação desses radionuclídeos aos anticorpos monoclonais, para uso na imagem e terapia, continuam exercendo atração e considerável atenção dos pesquisadores. O recente desenvolvimento na radiomarkação de anticorpos destaca 3 grandes áreas: marcação com Iodo-131, marcação com Índio-111 e marcação com Tecnécio-99m.

O Iodo-131 tem sido o radioisótopo mais usado para a marcação de anticorpos monoclonais pelos procedimentos corretos da radiolocalização, baixo custo, eficácia comercial e meia vida de 8 dias compatível com o pico de acumulação do anticorpo no tumor. As desvantagens incluem a sua energia de fóton alta (360 KeV), a emissão de partículas β e o fenômeno que ocorre *in vivo* da desiodação do anticorpo radioiodado produzindo iodeto livre que provoca a diminuição da radioatividade no tumor e aumento do acúmulo na tireoide e estômago trazendo, como consequência, problemas na imagem. Uma alternativa para contornar o problema da

de iodação *in vivo* dos anticorpos monoclonais radioiodados e o uso de radionuclídeos que apresentam vantagens dosimétricas e instrumental como os radiometálicos Índio-111 e Tecnécio-99m

ÍNDIO-111

Como radiometálico este radionuclídeo pode ser ligado aos anticorpos via tecnologia quelante bifuncional. Há porém a possibilidade de ser a biodistribuição do traçador alterada por mudança na espécie de quelante empregado ou do método usado na sua ligação

O ^{111}In com meia vida de 67 horas, energia de fótons de 171 e 245 KeV compatível com colimadores e gama câmaras convencionais e a ausência de emissão β mostrou-se vantajoso ao ^{131}I , porém, ao contrário do sucesso relativamente uniforme de proteínas marcadas por vários métodos de iodação, muitos investigadores não obtiveram resultados consistentes com quelatos de anticorpos marcados com ^{111}In . Apresentam uma resolução no mapeamento (cintigrafia) melhor que o ^{131}I porém a maior desvantagem está no significativo acúmulo hepático de radioatividade que ocorre ao longo da meia vida biológica resultando uma dose absorvida igual ao do ^{131}I . O ^{111}In é adequado somente para o uso em mapeamentos (cintigrafias) de órgãos distantes do fígado. Já o ^{131}I apesar de ser concentrado no pescoço pela glândula tireoide tem esta dificuldade contornada pela administração previa de uma droga bloqueadora da tireoide

TECNECIO-99m

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pela meia vida física de 6 horas, energia de fóton de 140 KeV e ausência de emissão β é o isótopo mais largamente usado como traçador em MEDICINA NUCLEAR. É preparado conveniente e localmente por eluição de uma coluna de ^{99}Mo (meia vida de 67 horas) e não obstante o seu decaimento rápido e sua química pouco entendida é bastante usado na marcação de proteínas. Porém, apesar das propriedades nucleares ideais, a sua meia vida curta (incompatível com o pico de acumulação no tumor) e a ausência de uma metodologia adequada para a radiomarcagem, não logrou êxito como radiotraçador para anticorpos monoclonais em estudos imunocintilográficos. Agora, porém, com o desenvolvimento de métodos práticos para marcação de anticorpos com alta eficiência e estabilidade da

preparação o ^{99m}Tc tornou-se no momento uma boa alternativa para a radiomarcagem de anticorpos pois além de fornecer melhor imagem reduz a dose de radiação para o paciente.

Não obstante o grande avanço alcançado no modelo químico complexos quelantes e a disponibilidade de radionuclídeos com uma única característica de decaimento, o padrão para comparação de um anticorpo monoclonal radiomarcado continua sendo o da proteína radiotodada pois não existe ainda nenhuma alternativa claramente superior ao ^{131}I .

A preparação de radiofarmacos a partir de anticorpos monoclonais depende de um sistema de marcação que conduza a uma ligação consistente com o radionuclídeo selecionado, sem afetar significativamente a molécula do anticorpo, purificação e avaliação do composto marcado quanto as suas características que o adequam aos estudos *in vivo*. Neste sentido desenvolveram-se vários métodos para a marcação de anticorpos usando ^{131}I e radiometálicos, especialmente o ^{99m}Tc .

O anticorpo monoclonal contido no fluido ascítico é removido por afinidade cromatográfica em proteína A-Sepharose. Todos os contaminantes protéicos presentes no fluido ascítico, como as proteínas séricas precisam ser removidas antes da radiomarcagem, somente então os anticorpos são radiomarcados.

Se os anticorpos são fornecidos comercialmente a sua especificidade e pureza são testadas pelo fornecedor, porém se forem produzidos em laboratório necessitam ser caracterizados, usando métodos imunológicos apropriados, antes da radiomarcagem.

RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPOS COM ^{131}I

Entre os vários sistemas disponíveis para a radiotodagem de imunoglobulinas os mais usados são Cloramina T, Lactoperoxidase e Iodogen.

É importante lembrar que os anticorpos são moléculas bioquímicas sensíveis sujeitas, durante a iodagem, a perda da atividade essencial ao seu modo de ação, especialmente a habilidade de ligação ao antígeno. O Iodogen, método de iodagem brando, eficiente, reprodutível e tecnicamente simples, é método apropriado a marcação de biomoléculas sensíveis como os anticorpos. A iodagem da imunoglobulina e desenvolvi-

da por simples adição de ^{131}I ao tubo de reação, previamente preparado, seguido pela imunoglobulina nas quantidades adequadas para a atividade específica desejada. O tempo de reação é tipicamente de 10 minutos a temperatura ambiente. A reação é encerrada por diluição com tampão uso e remoção do produto marcado do tubo de reação. Verifica-se a eficiência de marcação, percentual de ^{131}I incorporado a molécula de imunoglobulina, promovendo-se a seguir a purificação do produto marcado.

Um sistema de purificação razoavelmente simples utiliza uma coluna de troca iônica Ag 1-X8, 100-200 mesh, forma cloreto.

Preparo da coluna

A coluna (seringa, de 1 ml de plástico, descartável) é preenchida com a resina Ag 1-X8 lavada com 40 ml de tampão fosfato 0,125M, pH 7,5 e carregada a seguir com 25mg de albumina humana dissolvida em pequeno volume de solução fisiológica. A albumina, que não se adsorveu com alta afinidade a resina de troca iônica, é removida por uma nova lavagem da coluna com 40 ml de tampão fosfato 0,125M, pH 7,5. Esta coluna não pode tornar-se seca durante a lavagem, antes e durante o processo de purificação.

A preparação radiotodada é aplicada a coluna e eluída com tampão fosfato 0,125M, pH 7,5. O primeiro eluato (1 ml) corresponde a imunoglobulina- ^{131}I pura e pode ser estocada, para ensaios futuros, por 2 semanas.

Tanto a eficiência de marcação como a pureza radioquímica podem ser avaliadas por um sistema de cromatografia miniaturizada.

RADIOMARCAÇÃO DE ANTICORPOS COM $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Embora radioisótopos como ^{131}I e isotopos metálicos como ^{111}In apresentem valores inquestionáveis como traçadores em estudos de detecção empregando anticorpos anti-tumores, as propriedades nucleares ideais do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para estas aplicações são evidentes. Como consequência a marcação de proteínas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ teve o seu desenvolvimento estimulado desde a disponibilidade deste radionuclídeo para uso em MEDICINA NUCLEAR. Não obstante a sua energia de foton de 140 KeV e a ausência da emissão β a sua meia vida curta, incompatível com o pico de acumulação no tumor e a ausência de uma metodologia adequada de radiomarcção, não al

cançou bom êxito como radiotraçador para anticorpos monoclonais em estudos imunocintigraficos. Agora, porém, com o desenvolvimento de métodos práticos para a marcação de anticorpos monoclonais com alta eficiência e estabilidade da preparação o ^{99m}Tc e no momento uma boa alternativa para a radiomarcção de anticorpos monoclonais pois além de uma imagem melhor a dose de radiação para o paciente é bastante reduzida.

A marcação de anticorpos monoclonais com ^{99m}Tc pode ser dividida em 2 categorias:

- 1 Método direto de marcação (uso de grupos endógenos do anticorpo)
- 2 Método indireto de marcação (uso exógeno de um agente quelante bifuncional)

1 Método direto de marcação

Muitos anticorpos possuem na sua estrutura sítios potenciais que se ligam a íons metálicos, porém a estabilidade do traçador é limitada e os sítios de ligação ao metal são geralmente inespecíficos e não estão claramente definidos. Alguns trabalhos relatam a aparente instabilidade do traçador pelo acúmulo excessivo no fígado, atribuído a presença de colóides radiomarcados e acúmulo na tireoide, estômago e intestino, atribuído a oxidação *in vivo* do traçador para $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ pertecnetato. Apesar disto os métodos diretos de marcação são de execução simples, rápida e apropriadas a formulação de "kits" comerciais. Inicialmente foram desenvolvidos e estudados vários métodos diretos de marcação de anticorpos com ^{99m}Tc . Alguns desses métodos envolvem reação do anticorpo com reagente sal estânico que presumivelmente reduz algumas pontes dissulfídicas para grupos sulfidrílicos livres que se ligam ao ^{99m}Tc . Esses métodos empregam a sequência comum de reações químicas, embora possam variar os agentes redutores para o anticorpo e para o $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ pertecnetato. Essas variações envolvem primeiramente métodos alternativos de redução do anticorpo.

REDUÇÃO DO ANTICORPO

O anticorpo pode ser reduzido com monotiois como o 2-mercaptoetanol ou o 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól.

O método de redução do anticorpo com íon estânico foi chamado de **pretinning** porque o estanho desempenha 3 funções: redução das pon-

tes dissulfídicas formação de um complexo reversível com os grupos sulfidrílicos e redução do pertecnetato. A formação do complexo intermediário é importante para a subsequente marcação com o ^{99m}Tc . Os grupos sulfidrílicos são vulneráveis a oxidação que resulta na formação, novamente, das pontes dissulfídicas. A oxidação dos grupos sulfidrílicos ocorre pela ação de oxigênio dissolvido, estimulado por traços de íons metálicos como Cu(II) e Fe(III) e pH alcalino.

Evita-se o rearranjo das pontes dissulfídicas por manutenção da proteína reduzida em pH ácido. Adição de um agente quelante para remover traços de íons metálicos e por proteção dos grupos sulfidrílicos livres com um reagente que pode ser subsequentemente removido. A adição de Zn(II) pode ser usada para proteger o grupo sulfidrílico entre a fase de redução e a fase de combinação do anticorpo reduzido com o ^{99m}Tc .

REDUÇÃO DO ÍON $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ PERTECNETATO

O $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ pertecnetato de sódio é comumente disponível de um gerador $^{99m}\text{Tc}/^{99}\text{Mo}$ com uma solução salina isotônica. Muitos métodos podem ser usados na redução de íon $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ pertecnetato para um íon metálico (tecnécio). Íons estanosos são agentes redutores comumente usados anteriormente e revistos agora. Recentemente o ácido ascórbico foi usado para reduzir o anticorpo e o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionito de sódio) para reduzir o pertecnetato de sódio.

Os novos métodos de redução usados na marcação direta de anticorpos com ^{99m}Tc apresentam estabilidade de ligação alta entre ^{99m}Tc e os grupos sulfidrílicos da proteína. Para otimizar esta reação a proteína (anticorpo) precisa ter grupos sulfidrílicos disponíveis para reconhecer o ^{99m}Tc formado pela redução de um agente complexante fraco.

Algumas reações secundárias podem produzir impurezas radioquímicas tais como baixa afinidade de ligação ao ^{99m}Tc , ^{99m}Tc colóides, ^{99m}Tc peptídeos ou agregados de anticorpos ou ^{99m}Tc complexos e também íons pertecnetato podem tornar-se uma impureza se a solução de pertecnetato de sódio adicionada não for completamente reduzida. Embora não tenha sido discutido extensivamente como minimizar as reações secundárias e decisivo uma redução apropriada da proteína antes da marcação e a remoção completa do excesso de agente redutor após a marcação.

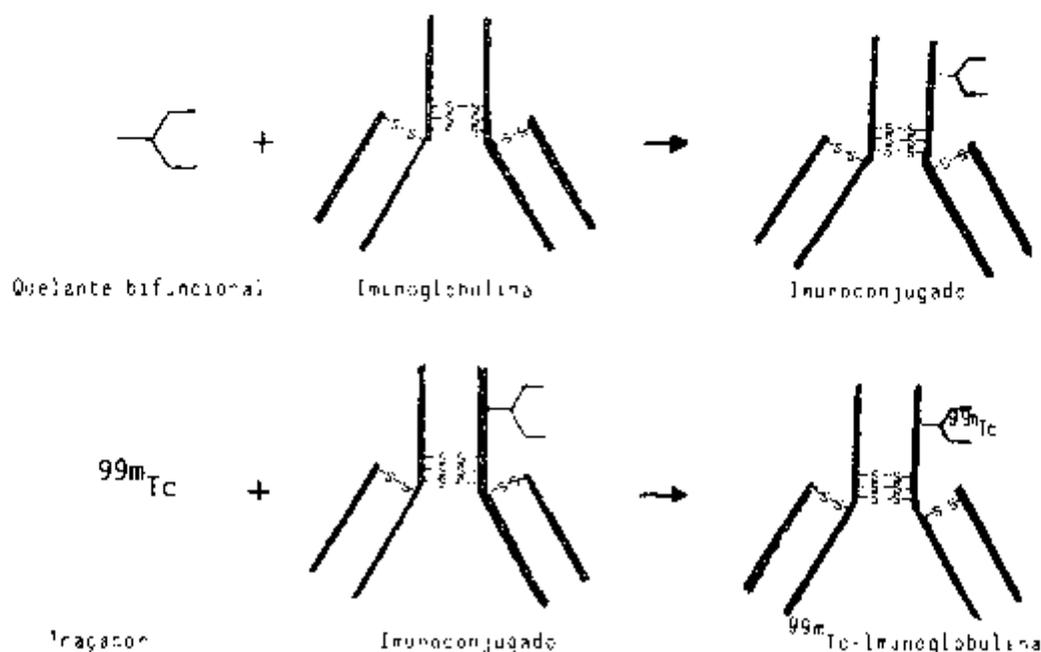
2 Metodo indireto de marcação de anticorpos com ^{99m}Tc

Envolve o uso de um agente quelante bifuncional. Os quelantes bifuncionais possuem radicais que se ligam fortemente a um dado íon metálico e por outro lado possuem também grupo funcional reativo que pode ligar-se covalentemente, através de aminoácidos disponíveis, a molécula do anticorpo. Os ácidos poliaminocarboxílicos são geralmente bons agentes quelantes de íons metálicos.

A marcação indireta de anticorpo pode ser efetuada de 2 formas

- Pode-se formar, primeiro o quelato radiometálico com posterior conjugação ao anticorpo. Apresenta a vantagem de ser a estrutura do quelato bem definida evitando a exposição do anticorpo as condições de queilação.
- Ou então o agente quelante bifuncional, é ligado primeiro ao anticorpo formando o imunogorjugado com posterior ligação ao radiometal.

Esquema geral para a marcação indireta de anticorpos usando quelantes bifuncionais



1. Envolve a ligação do quelante bifuncional a imunoglobulina (anticorpo) formando o imunogorjugado.
2. Envolve a queilação co ^{99m}Tc .

QUELANTES BIFUNCIONAIS USADOS NA MARCAÇÃO INDIRETA DE ANTICORPOS COM ^{99m}Tc

- DTPA (dietileno triamina pentaacetico) foi inicialmente usado como agente quelante na marcação indireta de anticorpos com ^{99m}Tc ate que se percebeu de que era incapaz de impedir a ligação do ^{99m}Tc para sítios inespecíficos da proteína
- Metalotionina De peso molecular baixo As ligações inespecíficas relatadas estão em torno de 5% e aparentemente não se alteram as propriedades biológicas do anticorpo
- Dimetilsemicarbazona Embora apresentem sucesso na radiomarkação a cinetica de reação é lenta necessitando cerca de 3 horas para alcançar 90% de eficiência de marcação
- Diamida-dimercaptida Quando se usa este agente quelante 90% de eficiência de marcação é alcançada em 1 hora No entanto, os anticorpos marcados são instaveis aparentemente devido ao fato deste agente quelante não ser capaz de prevenir ligações inespecíficas de ^{99m}Tc

A maior desvantagem do metodo indireto de marcação de anticorpos com ^{99m}Tc é a exigencia de multiplas etapas no procedimento da marcação assim como a purificação apos a marcação dificultando o preparo de "kits" comerciais

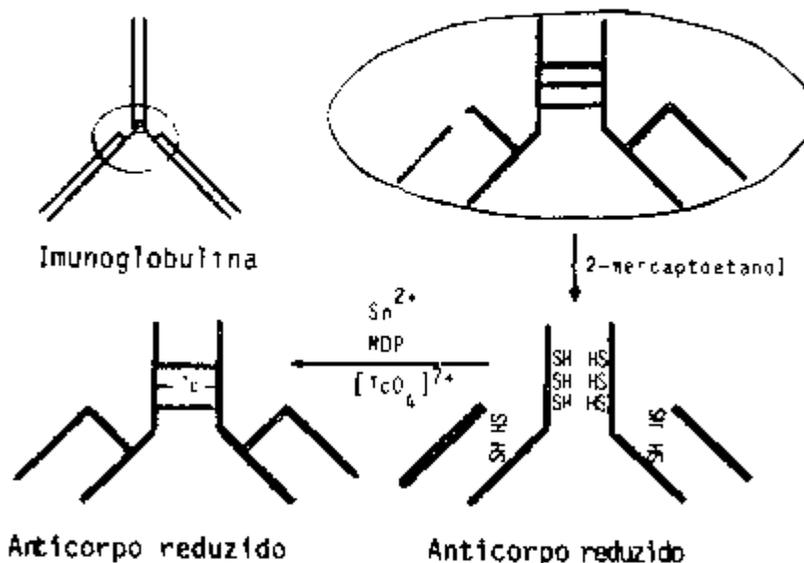
Embora o metodo de marcação indireta apresente vantagens sobre o metodo direto, a influencia da cinetica de reação lenta, a atividade especifica baixa, a dificuldade em se evitar as ligações inespecíficas e que para o uso clínico os radiofarmacos necessitam procedimentos simples de marcação com pureza e estabilidade altas das moléculas traçadoras resultantes, as atenções retornaram-se para a ligação do radionuclídeo para os grupos sulfidrílicos livres, ou seja para o uso do metodo direto de marcação

Para a marcação direta de anticorpos com ^{99m}Tc é necessario produzir sítios de ligação com alta afinidade, por redução do anticorpo Como é importante que as propriedades nativas do anticorpo não sejam alteradas, é conveniente que a redução ocorra em um tipo de classe de grupos dissulfidrílicos, isto é, grupos que não estejam envolvidos na manutenção da estrutura proteica para evitar alterações nas fun

ções biológicas do anticorpo

Mather e Ellison (1990) descreveram um método simples e prático para marcação direta de anticorpos com ^{99m}Tc . As pontes dissulfídicas, dentro da molécula do anticorpo, são quebradas com o uso do redutor 2-mercaptoetanol e após uma purificação subsequente o anticorpo reduzido e marcado por $[\text{}^{99m}\text{Tc}]$ pertecnetato reduzido via Sn^{2+} na presença de um ligante fraco (metileno difosfonato - MDP). Eficiência de marcação alta (>97%) na fase final de marcação é alcançada em poucos minutos.

Esquema geral da marcação



- As cadeias dissulfídicas no anticorpo são quebradas com o uso do redutor 2-mercaptoetanol
- O anticorpo reduzido é purificado e estocado em condições apropriadas para uso posterior
- A marcação é efetuada por redução do pertecnetato via Sn^{2+} na presença de um ligante fraco MDP (metileno difosfonato)

Quando se usa radionuclídeos de meia vida curta como o ^{99m}Tc é desejável que os procedimentos de marcação sejam rápidos, para minimizar as perdas devido ao decaimento radioativo e simples para que possa ser largamente aplicável. O método acima descrito preenche todos estes requisitos. O procedimento é simples, a fase final de marcação é rápida com alta eficiência de marcação. É método particularmente adequado ao desenvolvimento de "kits" comerciais.

CONTROLE DE QUALIDADE DOS ANTICORPOS RADIOMARCADOS

Procedimentos de CONTROLE DE QUALIDADE para anticorpos radiomarcados

Procedimentos	Qualidade medida
Cromatografia de camada delgada (TLC)	Pureza radioquímica, percentagem de radioatividade ligada a proteína
Cromatografia miniaturizada	Pureza radioquímica, percentagem de radioatividade ligada a proteína
Cromatografia líquida de alta pressão	Pureza radioquímica, percentagem de radioatividade ligada a proteína, presença de agregados ou fragmentos
Imunoreatividade	Habilidade do anticorpo monoclonal para ligar-se especificamente ao antígeno alvo
USP - teste de esterilidade	Presença de microorganismos aeróbicos e anaeróbicos
Teste de Limulus amoebocyte lysate (LAL)	Presença e quantificação de endotoxinas

6 APLICAÇÃO DOS RADIOIMUNOFÁRMACOS

A administração de anticorpos radiomarcados com propósitos diagnósticos não é um conceito novo. Surgiu em torno de 1945 com o início da MEDICINA NUCLEAR. Presman e col (1948,1949) descreveram métodos de incorporação de radioiodo em anticorpos policlonais. Presman e col em 1953 e posteriormente Bale e col (1955) utilizaram anticorpos radiomarcados na detecção do câncer em animais. Contudo a aplicação desses reagentes ficou prejudicada pela limitação de métodos imunológicos, incluindo a preparação de anticorpos, e preparação de antígenos, associados a tumor, bem definidos.

Conceitualmente a transformação maligna pode ser acompanhada por mudanças fenotípicas celulares que incluem perda de componentes normais ou ganho de outros não expressos na célula. Este componente neo expresso, se for reconhecido pelo sistema imune como estranho, é um antígeno tumoral. Antígenos associados a tumor são usados na produção de anticorpos específicos.

A combinação do desenvolvimento de antígeno específico associado a tumor como o antígeno específico CEA (antígeno carcinoembrionário) e do método de radioensaio, associação das características de certas reações imunológicas as extremas sensibilidade e precisão das medidas físicas da radioatividade, descrito por Yalow e Berson (1960) possibilitou estudos ulteriores de marcação de anticorpos contra alguns antígenos associados a tumores (Gol e Freedman (1965), Primus e col (1973), Goldenberg e col (1978). Esses anticorpos, porém, por serem policlonais localizavam-se em tecidos tumorais e não tumorais dificultando a caracterização precisa da imagem (Dovillard e col, 1985).

O advento da TECNOLOGIA DE HIBRIDOMA e a subsequente disponibilidade de anticorpos monoclonais contra um único determinante antigênico humano, podendo carregar radionuclídeos especificamente para células ou órgãos, possibilitou a produção de radiofarmacos altamente específicos. A vantagem do anticorpo monoclonal está na sua homogeneidade e especificidade para os antígenos imunizantes.

A detecção do tumor usando anticorpo monoclonal radiomarcado

apresenta particular interesse porque nas ligações *in vivo* são usados como verdadeiros mísseis cujas "ogivas nucleares" se dirigem seletivamente a seus alvos, células que exibem os antígenos específicos, ou seja os tumores, sem que as demais células do organismo fiquem comprometidas pela radioatividade das substâncias transportadas

Nestes últimos anos, o uso de anticorpos monoclonais radio-marcados trouxe um grande avanço experimental e clínico no campo da oncologia. Estes reagentes possuem potencial para serem usados com precisão no diagnóstico (radioimunodeteção) e com eficácia no tratamento (radioimunoterapia) de tumores malignos. A principal exigência desta metodologia é a disponibilidade de radiofarmacos estáveis que após a marcação *in vivo* retenham a capacidade de interação específica com o antígeno definido e mantenham a sua integridade molecular. Nos estudos pos-marcação a imunorreatividade é um parâmetro crítico. É necessário o desenvolvimento de métodos seguros de avaliação da imunorreatividade, percentual de anticorpo marcado que é associado ao antígeno específico.

Radioimunodeteção As técnicas convencionais de diagnóstico radiologia, Raio-X, tomografia computadorizada, ressonância magnética nuclear e ultrassom detetam o tumor somente pelos seus atributos físicos (tamanho, forma, posição e deslocamento de outros tecidos, e as técnicas convencionais usadas em MEDICINA NUCLEAR demonstram as neoplasias pelo seu metabolismo ou pelo metabolismo nos tecidos circunvizinhos. Estas técnicas são sensíveis mas não são específicas. Para melhorar a especificidade foi desenvolvida a técnica de radioimunocintilografia onde a detecção do tecido canceroso é obtida por interação do anticorpo radiomarcado com o antígeno específico. Muitos sistemas antígeno-anticorpo foram usados para imagem de diferentes tumores. A experiência demonstrou que, apesar da simplicidade conceitual, esses estudos são mais complexos do que se poderia supor. Na prática clínica muitos fatores influenciam o sucesso da sua aplicação. *In vitro*, pelo princípio da lei da ação das massas, largamente usado no radioensaio, as condições de equilíbrio entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ab) são prontamente alcançados. *In vivo*, porém, pela dificuldade em se estimar a concentração do antígeno com o qual o anticorpo entrara em contato, o alcance deste equilíbrio é mais complicado. O antígeno deve localizar-se na membrana da célula para ser aces-

sível ao anticorpo-traçador circulante. É necessário, também, que as células normais não expressem o antígeno ou no mínimo que a concentração do antígeno em células normais sejam 100 vezes menores que nas células tumorais. Outros fatores como tamanho, sítio das lesões e fenômenos biológicos como carencia da expressão do antígeno pelo tumor, interferem no resultado. Apesar destas dificuldades alguns grupos obtiveram bons resultados utilizando estes procedimentos.

No momento em relação a aplicação clínica de anticorpos radiomarcados o maior sucesso e um exemplo clássico de diagnóstico radioimunológico de tecido não maligno que é a detecção de infarto do miocárdio por anticorpos monoclonais anti-miosina. A miosina é a proteína mais abundante nas células cardíacas. É uma macromolécula, peso molecular em torno de 500 000 daltons, com um grande número de determinantes antigênicos, portanto altamente imunogênica. É um antígeno ideal para induzir uma resposta imune específica, ponto de partida para a obtenção de anticorpos monoclonais.

O músculo cardíaco tem contrações rítmicas e metabolismo completamente aeróbico em todos os instantes. Pelo fato do coração ser normalmente aeróbico e obter praticamente toda a sua energia da fosforilação oxidativa, a impossibilidade do oxigênio atingir uma porção do músculo cardíaco, quando os vasos sanguíneos são bloqueados por depósito de lipídeos, pode ocasionar a morte desta região do músculo cardíaco, processo conhecido como infarto do miocárdio. A aplicação de radiofarmacos na imagem do infarto do miocárdio apresenta considerável interesse e atividade. Nos estudos iniciais os radiofarmacos empregados incluíam ^{203}Hg -clormerodrin, ^{203}Hg -mercuriofluoresceína e ^{67}Ga -citrato. O ^{201}Tl é um radiotraçador bastante usado nos estudos de perfusão do miocárdio, porém, não é um radiotraçador ideal pois a sua meia vida física longa e a depuração miocárdica lenta dificulta a avaliação em série e também a baixa energia de radiação compromete a imagem. A localização adequada do miocárdio infartado pode ser realizada com compostos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetraciclina, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucoheptonato, e vários compostos de fosfato, particularmente o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pirofosfato o maior sucesso clínico na imagem do miocárdio infartado, porém a sua especificidade não é exclusiva para o infarto do miocárdio podendo ocorrer no músculo esquelético e carcinoma do pulmão e a sua concentração não é proporcional a

nível miocárdial

Após o infarto do miocárdio o dano irreparável às células conduz a um aumento na permeabilidade da membrana celular permitindo a entrada de macromoléculas na célula, o que não acontece com o miocárdio normal. Se a molécula extracelular é um anticorpo monoclonal para um componente intracelular, concentra-se dentro do tecido danificado. Assim um anticorpo monoclonal para miosina cardíaca identifica necroses do miocárdio por localizar-se nas membranas das células danificadas. Essa localização identificada por cintilografia, permite diagnóstico e a avaliação rápidos nos quadros de infarto. Neste sistema os componentes intracelulares são usados como antígenos para o imunodiagnóstico.

PREPARAÇÃO DA MIOSINA CARDÍACA A miosina cardíaca humana usada como antígeno na obtenção de anticorpo monoclonal anti-miosina, pode ser extraída do músculo cardíaco fresco. A sua concentração é determinada por espectrofotometria e a homogeneidade da preparação pode ser observada através de eletroforese em gel de poli-acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A amostra de miosina separa-se em bandas de cadeias pesada, leve e traços de proteínas contaminantes. A miosina extraída do músculo cardíaco pode ser purificada por cromatografia de troca iônica em gel de dietil-amino-etil DEAE-Sephadex A-50 (forma cloreto) ou dietil-amino-etil DEAE-celulose.

A miosina, assim obtida, é usada na imunização de camundongos BALB/c isogênicos Khaw e col (1984), utilizando a tecnologia de hibridoma, desenvolveram anticorpo monoclonal para miosina cardíaca denominado R₁₁D₁₀ que ligados a substâncias radioativas concentram-se dentro do tecido danificado tornando-se o agente ideal para visualização do infarto do miocárdio. Ligam-se, especificamente, a miosina cardíaca exposta delineando precisamente necrose do miocárdio em pacientes infartados.

Do ponto de vista teórico a cintilografia obtida com anticorpo monoclonal anti-miosina parece ser método apropriado para avaliar a extensão das células danificadas em patologias como miocardites e rejeição cardíaca. O diagnóstico da miocardite ativa é feito ainda por sintomas clínicos e biópsia endomiocárdica que, por ser método pouco sensível, dificulta a decisão em relação a terapia. Nestes pacientes há ne

cessidade de um teste que possa documentar a extensão do dano miocárdio. Pacientes que sofreram transplante do coração, o diagnóstico da rejeição cardíaca, principalmente no primeiro ano após a cirurgia quando a ocorrência de rejeição cardíaca é mais frequente, é feito sequencialmente por biópsia que determina o grau subsequente da terapia imunossupressora. Devido a baixa sensibilidade e o alto custo da biópsia sequencial há uma clara necessidade de métodos alternativos para este diagnóstico.

Radioimunoterapia Requer um desenvolvimento maior que a radioimunodeteção. Até o presente a radioimunoterapia é considerada como um método experimental para tratamento de tumores sólidos. Mesmo que se alcance uma regressão tumoral após doses terapêuticas de radioimunofarmacológico, são necessários estudos básicos posteriores e provas clínicas para otimizar numerosos aspectos do método.

É necessário ser provado que o tumor produz o antígeno (biópsia de tecido metastático método avidin-biotina imunoperoxidase). Precedendo a terapia deve-se fazer uma imunocintilografia com o objetivo de confirmação *in vivo* do acúmulo do radioimunofarmacológico no tumor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 CAICH, V L G & VAZ, C A C *Imunologia básica* Artes Médicas, 1988
- 2 LANGONE, J J & VUNAKIS, H V Immunochemical techniques In COLOWICK, S P , KAPLAN, N O eds *Methods in Enzymology* Academic Press, 1986 v 121, parte 1
- 3 GODING, J W *Monoclonal antibodies principles and practice* 2 ed Academic Press, 1986
- 4 MISHALL, B B & SHIIGI, S M *Selected methods in cellular immunology* San Francisco, W H Freeman, 1979
- 5 MOREL, C M *Genes and antigens of parasites A laboratorial manual* Fundação Oswaldo Cruz, 1983
- 6 IMMUNOSCINTIGRAPHY with antimelanoma and anti-CEA monoclonal antibodies Saluggia (VC) Sorin Biomedica Italy [s d] (Compilação)